



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 :

Selma BOUZAHER

Le : [Click here to enter a date.](#)

Thème

**Isolement et sélection des souches bactériennes
productrice de cellulase à partir le liquide du
rumen de bovins.**

Jury :

Mr. Hakim HABEL MAA Université de Biskra Rapporteur

Mme. Manel DJOUAMAA MAA Université de Biskra Examineur

M. Nasser BELLOUCIF MAA Université de Biskra Président

Année universitaire : 2019 - 2020

Remerciements

Tout d'abord, louange à « ALLAH » qui m'a donné la santé, la force, le courage et l'opportunité de réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mr. HABEL d'avoir accepté d'être promoteur de ce mémoire.

Mes remerciements s'adressent également aux membres de jury d'avoir accepté de juger ce travail, notamment

..... (Examineur) et

..... (Président)

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers les personnes qui ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Avec un grand plaisir, et une joie immense, je dédie ce travail à mes chers parents qui m'ont soutenue le long de ma vie

A mon marie Zakaria qui m'a encouragé même dans les moments difficiles et me soutenir durant cette année surtout pour accomplir ce présent travail...

A ma fille Lina la source de joie

A la mère de mon marie

A mes frères : Belgacem, Hamza et Fatih

A ma sœur Chahira

A tous mes cousins et cousines ; grands et petits...

A mes amis de vie : Sondous, Khadidja, Rania.

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Listes des figures

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Introduction

Premier Partie : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 :

Matière lignocellulosique et enzyme cellulolytique

Structure de la Biomasse lignocellulosique :	3
1-1 Cellulose :	3
1-2 Hémicellulose :	5
1-3 Lignine :	5
1-4 Enzymes lignocellulosique :	6

Deuxième partie : Partie expérimentale

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

2-1 Echantillonnage.....	12
2-2 Isolement et sélection des souches cellulolytiques	12
2-3 Identification bactérienne	12
2-4 Tests morphologiques.....	13
2-5 Tests physiologiques.....	14
2-6 Tests biochimiques	16
2-8 Identification moléculaire.....	18

Chapitre 3 : Résultats et discussion

3-1 Isolement et criblage des bactéries productrices de cellulase	22
3-2 Test de sensibilité aux antibiotiques	23
3-3 Cinétique de croissance des isolats	24
3-4 Mesure de la production de cellulase	25
3-5 Coloration de Gram des bactéries productrices de cellulase	25
3-6 Optimisation de l'activité enzymatique de la cellulase à différents pH, températures, Sources de carbone.	27
3-7 Identification moléculaire.....	29
3-8 Séquençage d' ADN	29

Conclusion 31

Bibliographie

Annexes

Résumé

Figure 1. Représentation de la matière lignocellulosique montrant la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (Eloutassi et al ., 2014)	3
Figure 2 . Structure moléculaire de la cellulose (Brown, 2004).....	4
Figure 3. stratégie de dégradation de cellulose (Lakhundi et al., 2015).....	7
Figure 4. Etude de la cinétique de croissance	24
Figure 5. Capacité de production de cellulase des quatre isolats isolés du rumen.....	25
Figure 6. Activité enzymatique cellulase à différents pH.	28
Figure 7 . Visualisation des produits amplifiés par PCR par électrophorèse sur gel d'agarose	29
Figure 8. Arbre phylogénétique.....	30

Liste des abréviations

CMC : carboxyméthyle cellulose.

DNS : dinitrosalicylique.

E. coli = Escherichia coli.

EC : Enzyme commission

HC : Capacité d'hydrolyse.

ml = Millilitre.

MR = Rouge Congo.

PCI : Phénol chloroforme iso-amyle.

pH = Logarithme négatif de la concentration en ions hydrogène.

(T) °C = Température en degré Celsius.

TSI : triple sugar Iron.

Vp : Voges-Proskaur.

Tableau 1 . Classification des enzymes cellulolytiques	7
Tableau 2. Applications industrielle des cellulases.....	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 3. Valeur de la zone claire et de la capacité hydrolytique (HC) du CPB sur milieu CMC Congo rouge agar	22
Tableau 4. Antibiogramme.....	23
Tableau 5. Tests physiologiques	25
Tableau 6. Tests biochimiques.....	27
Tableau 7. Activité enzymatique de la cellulase à différentes températures	28
Tableau 8. Identification de l'organisme	30

Introduction

Le choc pétrolier de 1973, La croissance significative de la demande mondiale en énergie primaire qui signifie un recours accru aux énergies fossiles. En outre avec l'augmentation de prix de pétrole et l'aggravation des émissions des gaz à l'effet de serre, sont les principales causes qui justifient la recherche de solutions et de technologies alternatives, les énergies renouvelables sont la meilleure alternative durable.

Parmi ces énergies, la bioénergie est produite à partir de la biomasse et certains déchets tels que les déchets agricoles, les déchets de l'industrie agroalimentaire, les rejets de l'industrie du papier, les cultures énergétiques non destinées à l'alimentation en Algérie en dispose (Aziza, 2010). Tous ces déchets constituent des sources potentielles de cellulose, La valorisation de la cellulose est d'un intérêt considérable. Sa dégradation conduit à la production des composés chimiques et énergétiques qui jouent un rôle important dans le cycle de carbone et de l'énergie de la biosphère.

Elle peut également permettre de répondre aux besoins d'énergie des pays au cours de développement qui n'ont pas les moyens de se procurer les combustibles dont ils ont besoin. En outre que considéré comme une méthode pratique pour épurer les environnements contaminés et la bio-rémediation. La bioremediation est définie par l'utilisation des microorganismes pour détruire les polluants environnementaux (Perry et al., 2004).

En effet, la biomasse lignocellulosique contient des sucres polymérisés en cellulose et hémicellulose peut fournir la bioéthanol après plusieurs étapes de prétraitement et hydrolyse physique, chimique et biologique dite «bio raffinerie».

La bio raffinerie peut être défini comme un processus durable de transformation de la biomasse en produits bio basés (alimentation, produits chimiques, matériaux) et en bioénergie (biocarburants, électricité, chaleur). Le concept de bio raffinerie est analogue à celui de raffinage de pétrole qui produit différents carburants et produits chimiques (Margeot et Monot, 2009; Laurant *et al.*, 2011; Khelifa, 2009; Zeitoun, 2011).

Évaluation et optimisation de diverses sources de carbone a été menée par plusieurs chercheurs pour la production de cellulase à l'aide d'isolats bactériens provenant de différents échantillons (Immanuel et al., 2006; Sethi et al., 2013; Liang et al., 2014; Lugani et al., 2015; Nandimath et al., 2016).

L'objectif tracé pour la réalisation de ce travail est l'exploitation d'une nouvelle source d'isollements de microorganismes producteurs de cellulase, à savoir, le liquide du rumen de bovins

Ce document s'articule de la façon suivante :

Le premier chapitre présente les donnes de littérature concernant la biomasse lignocellulosique, les cellulases et les microorganismes cellulolytiques, La deuxième chapitre est consacré aux matériel et méthodes. Le troisième chapitre rapporte les résultats et leur discussion. A la fin une conclusion.

Premier Partie
Synthèse bibliographique

Chapitre 1 :
Matière lignocellulosique
et enzyme cellulolytique

Structure de la Biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique est une des ressources renouvelables les plus abondantes dans le monde, Elle regroupe à elle seule trois biopolymères : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine (fig. 1). Actuellement, la cellulose est la plus valorisée et ses dérivés se trouvent dans nombreuse applications (papier, additifs alimentaires, fibres textiles .etc.).

La matière lignocellulosique contient 40-60% de cellulose ,20-40% d'hémicellulose et 10-25% de lignine (Privas, 2013).

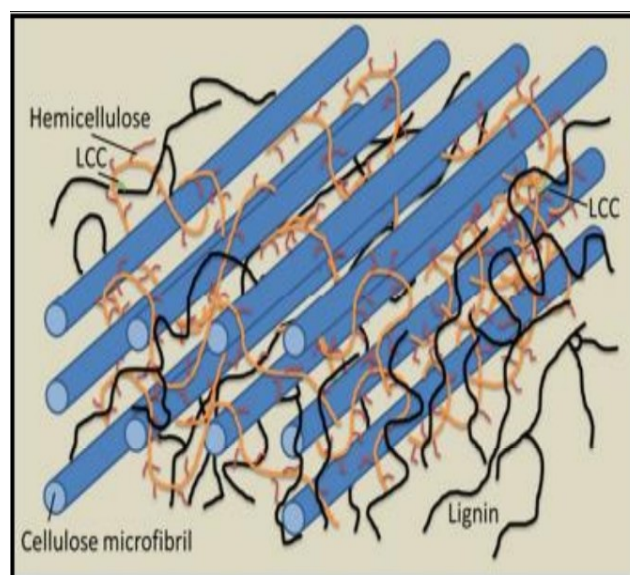


Figure 1. Représentation de la matière lignocellulosique montrant la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (Eloutassi et al ., 2014)

1-1 Cellulose

La cellulose est considérée comme le polymère renouvelable le plus abondant sur Terre (Dufresne ,2007).

La cellulose consiste en un homopolysaccharide linéaire composé d'unités β -D-glucopyranose liées ensemble par des liaisons β -(1-4) (Brännvall, 2007).

Chaque monomère porte trois groupes hydroxyle. Il est donc évident que ces groupes hydroxyle

et leur capacité à former des liaisons hydrogène joue un rôle majeur dans la direction du garnissage cristallin et aussi régissant les propriétés physiques de la cellulose (John, 2008).

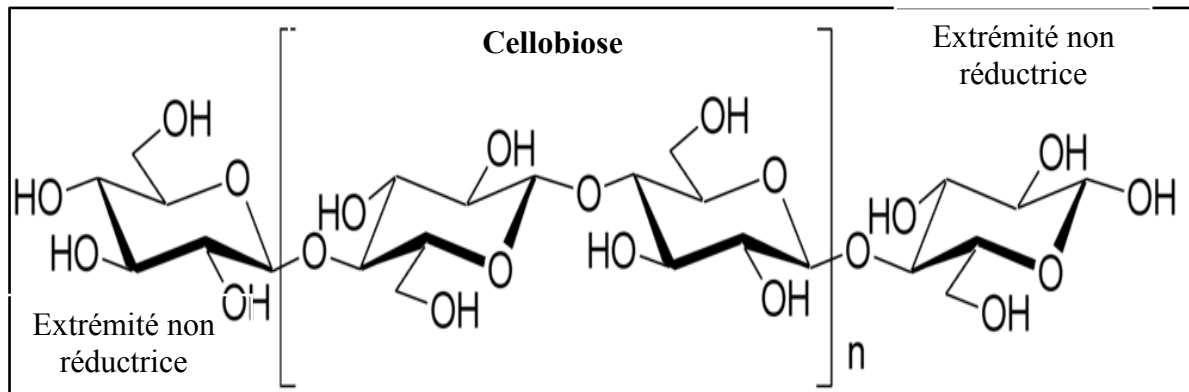


Figure 2 . Structure moléculaire de la cellulose (Brown, 2004)

Les molécules de cellulose forment une hélice à deux résidus par tour, stabilisées par des liaisons hydrogène (Zhbankov, 1992). L'observation au microscope électronique permet de distinguer une association des chaînes de cellulose par des liaisons d'hydrogène intra et inter moléculaire, forment des microfibrilles rigides et insolubles (Hasper *et al.*, 2002), constitue de deux types de structures :

Des structures cristallines de chaînes associées, par des liaisons hydrogènes difficiles à rompre (Baumgartier, 1949 ; Mouranche et coste ,1985). Ces derniers sont variables selon l'origine de cellulose : 20% pour celle de la paille, 35 à 50% pour celle du bois et 95% pour celle d'algue de *valonia* (Lin *et al.* ,1987 ;Béguin ,1994) .

Des structures amorphes, sans cohésions et plus faciles à hydrolyser (Mouranche et coste ,1985 ; Vidaud,1984) .

Certains auteurs estiment que la cellulose peut se présenter sous différents états (Bisaria et Chose ,1960) et classent la structure de la cellulose en deux groupes :

- La cellulose 1 : qui représente la forme naturelle ou native, présente dans le coton et le bois.
- La cellulose 2 : qui est une forme modifiée obtenue après traitement chimique (à la soude par exemple).

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'unité de glucose par molécule, est différent selon le végétal étudié et peut aller jusqu'à 16000 unités (Sun, 2010).

1-1-1 Dérivés de la cellulose

Les dérivés cellulosiques ont montré des propriétés spécifiques intéressantes pour de nombreuses industries (Captant, 1967). Parmi lesquelles :

▪ Carboxymethyl cellulose

La carboxymethyl cellulose (CMC) est un dérivé de la cellulose avec des groupes carboxyméthyle ($-\text{CH}_2-\text{COOH}$) liés à certains des groupes hydroxyle des monomères de glucopyranose qui composent 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).

▪ 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, obtenue sous forme de pulpe à partir de matière végétale fibreuses, avec des acides minéraux (Thoorens *et al.* 2014).

1-2 Hémicellulose

Les hémicelluloses constituent la matrice des parois, qui assure la liaison des microfibrilles entre elles par des liaisons d'hydrogènes, ces composés forment un groupe mixte d'hétéropolymères linéaires et ramifiés comportant principalement cinq sucres monomériques : D-glucose, D-mannose, D-galactose, D-xylose et L'arabinose (Fengel *et al.*, 1989 ;Kuhad *et al.*, 1997). De manière générale les hémicelluloses s'associer entre elle par des liaisons d'hydrogènes β -1-4 glycosidiques. Elles sont insolubles dans l'eau chaude ou froide et les acides dilués chauds (Chou *et al.*, 1997).

1-3 Lignine

La lignine est l'un des principaux constituants des biomasses lignocellulosique. Elle représente 20 à 30% du carbone de la biomasse végétale. Après la cellulose, c'est le second composé organique le plus abondant de la biosphère. La lignine est un nom générique pour désigner un ensemble de polymères phénoliques tridimensionnels, de masses moléculaires élevées, ramifiés, de compositions et de structures variables et complexes. Localisé dans la paroi primaire des cellules végétales, elle leur

confère imperméabilité, rigidité et inextensibilité. La lignine se présente comme un réseau structural tridimensionnel insoluble dans l'eau et très résistant aux attaques chimiques et enzymatiques. La très grande stabilité de la lignine associée à celle de la cellulose explique son rôle significatif dans la résistance mécanique, chimique et biologique de la grande majorité des biomasses lignocellulosique (Fengel & Wegener, 1983).

1-4 Enzymes lignocellulosique

Les végétaux étant la source de biomasse la plus importante sur terre, de nombreux organismes ont évolués au cours des millénaires afin de pouvoir les utiliser comme source de nutrition. On trouve de nombreux organismes fongiques et bactériens qui emploie une batterie assez diverse d'enzymes afin de réaliser la dégradation de la biomasse lignocellulosique.

1-4-1 Cellulases

Les organismes qui dégradent la cellulose sont principalement des champignons et des bactéries. Ils produisent pour cela plusieurs enzymes appartenant à un nombre restreint de familles, avec différentes spécialisations, qui agissent en synergie. Ces enzymes possèdent, en plus du domaine catalytique, un domaine non catalytique impliqué dans la fixation au substrat, la formation de complexes multienzymatiques, le rattachement au micro-organisme ou encore la protection face à la dénaturation enzymatique lors de la catalyse (Béguin and Aubert, 1994).

On dénombre trois principaux types de cellulases, les endocellulases (EG), exocellulase (CBH) et les β -glucosidase (β -GLU).

a) Endocellulases (EG) ou Endo β (1-4)-glucanase (EC 3.2.1.4)

Les endocellulases sont responsables de la catalyse aléatoire de la liaison osidique β -1,4 principalement dans la région amorphe de la cellulose (Béguin and Aubert, 1994 ; Zhang and Lynd, 2004).

b) Exocellulase (CBH) (EC 3.2.1.91)

Les exocellulases sont responsables de la catalyse progressive des extrémités libres de la cellulose amenant à la formation de glucoses et de cellobiose (Béguin and Aubert, 1994 ; Zhang and Lynd, 2004).

c) β -glucosidase (β -GLU) (EC 3.2.1.21)

Les β -glucosidases sont responsables de la catalyse la production de glucose à partir des cellodextrines (polymères β -1,4 de glucoses) solubles dans l'eau. Elles présentent une affinité Chapitre I : Etat de l'art 24 réduite à la cellulose, ce qui leur permet de rester préférentiellement dans le milieu liquide (Gomes *et al.*, 2015).

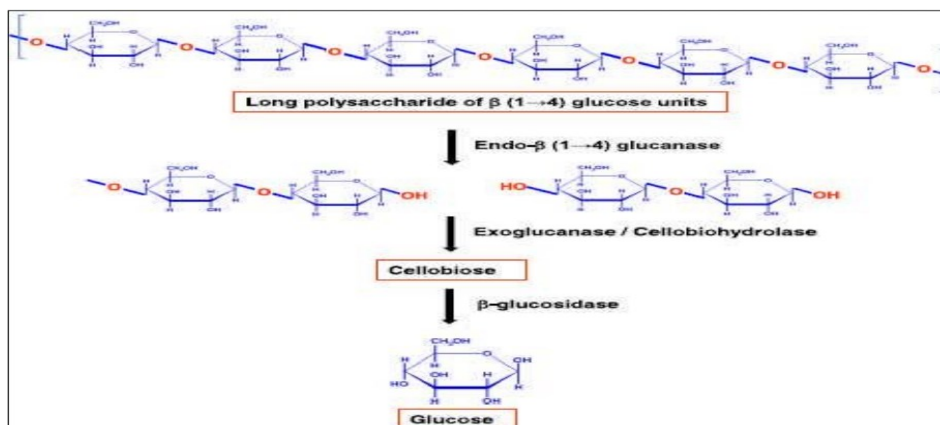


Figure 3. stratégie de dégradation de cellulose (Lakhundi *et al.*, 2015).

1-4-2 Classification des enzymes cellulolytiques et leurs systèmes d'action

Tableau 1 : Classification des enzymes cellulolytiques (Sadhu *et al.* , 2013) .

Enzyme	Numéro E.C.	Réaction	Autres noms	Famille
I. Endo -1,4 β -D-glucanglucanohydrolase	E.C.3. 2. 1. 4	Couper au hasard la liaison interne de cellulose amorphe et libèrent les oligosaccharides de différentes longueurs. Il agit sur Endo-1, 4- β -D-glucosidique.	Endoglucanase, Endo-1,4- β – glucanase, Carboxymethyl cellulase, β -1,4-endoglucon hydrolase,	5, 6, 7, 8, 10, 12, 44, 51, 61, 74

			Endocellulase	
II. Exoglucanase or 1,4-β-D-glucanocellobiohydrolases (cellobiohydrolases)	E.C.3.2.1.91	Hydrolyse des liaisons 1,4- β-D-glucosidiques de cellulose et libérant de cellobiose	Exoglucanase, Exocellobiohydrolase, 1,4- β-cellobiohydrolase.	5,6,7,9, 10,48
III. Exoglucanases ou 1,4-β-D-oligoglucan cellobiohydrolases	EC 3.2.1.74	Élimination du cellobiose de cellooligosaccharide ou au niveau de p-nitrophényl-β-D-cellobioside	Cellodextrinases	-

1-4-3 Applications industrielle des cellulases.

Tableau 2 : Applications industrielle des cellulases. D'après (Mandel, 1985)

<p>1-Extraction des parois végétales :</p>	<p>a-Extraction des contenus cellulaires (arômes, enzymes, polysaccharides (agar), protéines),</p> <p>b- Amélioration de la réhydratation de végétaux séchés,</p> <p>c- Augmentation de la digestibilité d'aliments très fibreux</p>
<p>2-Production de glucose et de sucres solubles :</p>	<p>a) Alimentation animale : produits directs ou secondaires de la mélasse, accroissement de la valeur nutritive des aliments fibreux,</p>

<p>3 - Production de lignine :</p> <p>4-Applications Alimentaires diverses :</p>	<p>protéines d'organismes unicellulaires,</p> <p>b) Produits industriels : (colles, produits chimiques : éthanol, butanol, etc.;</p> <p>c) Matière première de l'industrie des fermentations ; (antibiotiques, acide citrique, etc...</p> <p>(matière première de l'industrie chimique)</p> <p>a- Production de protéines.</p> <p>b- Aliments fermentés/organismes cellulolytiques (addition de protéines mycéliennes et extracellulaires) extraction des fibres, conversion des fibres en sucres, extraction d'autres composés indésires).</p> <p>c) Protéases fongiques. (protéases acides de Trichoderma pour le traitement de la viande).</p>
--	---

1-4-4 La cellulolyse et les 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.

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 (Tchundem, 1990).

1-4-4-1 Microorganismes eucaryotes

Ce groupe comprend les protozoaires et les champignons.

▪ Les protozoaires

L'étude de la dégradation de la cellulose en sucres par les protozoaires présente des difficultés dues à l'interférence des métabolismes des bactéries symbiotiques hébergées.

▪ Les champignons cellulolytiques

C'est en 1950 que REESE a mis en évidence une activité cellulolytiques chez les champignons saprophytes. Ces champignons appartiennent principalement à la classe des champignons imparfaits et à celle des basidiomycètes. (Tchundem, 1990).

1-4-4-2 Microorganismes procaryotes

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

○ Bactéries cellulolytiques

Les bactéries ont été moins étudiées que les champignons. Cependant certaines d'entre elles ont fait l'objet de nombreux travaux. *Clostridium thermocellum* est la bactérie cellulolytiques la mieux connue et la plus étudiée. Elle permet la conversion directe de la cellulose en éthanol, en acides organiques et en gaz (CO₂, H₂). C'est l'une des rares bactéries qui produit des cellulases aussi efficaces dans l'hydrolyse de la cellulose cristal line (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 haut poids moléculaire (2 millions de daltons) appelé cellulosome (LAMED *et al.* 1983 ; BAYER *et al.* 1983), Cet agrégat est résistant à la plupart des agents dénaturants mais un traitement en présence du dodécyl sulfate de sodium(SOS) au-dessus de 70°C permet de dissocier le complexe (LAMED *et al.*, 1983).

A côté de *Cl. Thermocellum.*, certaines bactéries ont été également étudiées et possèdent des caractéristiques remarquables. C'est le cas de *Bactéroides succinogenes* qui est capable de dégrader les celluloses les plus cristallines. Elle adhère fortement aux fibres de cellulose (Tchundem, 1990).

Les bactéries du genre *Ruminococcus* sont capables d'assimiler de nombreux substrats carbonés. *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* sont capables d'utiliser le xylène, le cellobiose mais ne fermentent pas les oses simples. De plus, *Ruminococcus albus* stocke les réserves sous la forme de granules intracellulaires de glycogène (Tchundem, 1990).

Deuxième partie
Partie expérimentale

Chapitre 2 :

Matériels et méthodes

2-1 Echantillonnage

Les échantillons de liquide du rumen de bovins ont été collectés à l'abattoir dans des conditions aseptiques. Les fluides du rumen recueillis ont été filtrés à travers une couche de tissu de mousseline. Ensuite, le fluide du rumen a été versé dans des flacons stériles étiquetés et conservé dans un récipient stérilisé à 4 ° C (Olyad *et all*, 2020).

2-2 Isolement et sélection des souches cellulolytiques

Les échantillons de liquide du rumen collectés ont été inoculés dans un milieu salin basal (NaNO₃ =2,5 g, KH₂PO₄ =2 g, MgSO₄=0,2 g, Na Cl= 0,2 g, CaCl₂ · 6H₂O= 0,1 g dans un litre) contenant papier filtre (papier filtre Whatman n ° 1 de surface 70,541 cm²) pour l'isolement des bactéries cellulolytiques. (Gupta *et all* 2012).

Ces cultures étaient incubé pendant 7 jours dans un incubateur à agitateur à 37 ° C à 100 tr / min. Colonies bactériennes capables d'utiliser la cellulose comme seule source de carbone ont été isolés sur des milieux celluloliques composés de KH₂PO₄= 0,5 g, MgSO₄ =0,25 g, de cellulose 2,0 g, d'agar 15 g de gélatine 2 g et eau distillée 1 L et à pH 6,8–7,2 (Gupta *et all* 2012).

Un test de dépistage du CPB Congo-rouge a été ajouté. Puis des dilutions (10⁻¹ à 10⁻⁷).

Les colonies présentant une décoloration du rouge-congo ont été considérées comme positives pour la dégradation de la cellulose bactérienne.

Le potentiel de dégradation de la cellulose des isolats positifs était également estimé en calculant la capacité d'hydrolyse (HC), c'est-à-dire le rapport du diamètre de la zone de défrichement de la colonie (Kena, *et all* 2015).

2-3 Identification bactérienne

Les isolats bactériens ont été présumés identifiés au moyen de méthodes morphologiques et caractéristique. Les résultats sont été comparés avec le manuel de Bergey sur les bactéries déterminatives (Kena, *et all* 2015).

▪ Test de sensibilité aux antibiotiques

Des tests de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisés en utilisant la méthode de diffusion sur disque (Kena, *et all* 2015).

▪ Cinétique de croissance des isolats

Le bouillon nutritif a été inoculé avec une boucle de culture d'essai. La densité optique a été mesurée pendant neuf jours à 620 nm toutes les 2, 4, 8, 16, 18, 24, 36, 48 et 72 heures d'incubation. Milieu non inoculé utilisé comme blanc. Le graphique de le temps O.D v / s a été tracé (Kena, *et all* 2015).

▪ Dosage enzymatique

L'activité cellulolique totale a été déterminée en mesurant la quantité de sucre réducteur formé à partir de CMC. L'activité de l'endoglucanase a été dosée en mesurant la quantité de sucre réducteur partir de cellulose amorphe (Kena, *et all* 2015).

▪ Mesure de l'activité enzymatique

L'activité de cellulase totale dans le filtrat de culture a été déterminée selon la méthode standard. Des aliquotes de filtrat de culture dilué de manière appropriée comme source d'enzyme ont été ajoutées à une bande de papier filtre Whatman numéro 1 (1 x 6 cm ; 50 mg) immergée dans un millilitre de tampon citrate de sodium 0,05 M de pH 4,8. Après incubation à 50 ± 2 ° C pendant 1 h, le sucre réducteur libéré a été estimé par la méthode à l'acide dinitrosalicylique (DNS) (Dillon *et all*, 2004). Une unité d'activité du papier filtre (FPU) a été définie comme la quantité d'enzyme libérant 1 μ mole de sucre réducteur du papier filtre par ml par min.

L'activité endoglucanase (CMCase) a été mesurée en utilisant un mélange réactionnel contenant 1 ml de carboxy méthylcellulose (CMC) à 1% dans un tampon citrate de sodium 0,05 M (pH 4,8) et des aliquotes de filtrat dilué de manière appropriée. Le mélange réactionnel a été incubé à 50 ± 2 °C pendant 1h et le sucre réducteur produit a été déterminé par la méthode DNS. L'activité β - glucosidase a été dosée par la méthode de pointage. Une unité (UI) d'activité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme libérant 1 μ mole de sucre réducteur par minute. (Kena, *et all* 2015).

2-4 Tests morphologiques

2-4-1 Observation macroscopique

C'est la première étape qui oriente le processus d'identification des bactéries. Elle porte sur les caractères

morphologiques. L'observation à l'œil nu est basé sur les éléments d'identification tel que la forme, la taille, l'opacité, l'aspect de la surface ...etc. (Denis *et al.* 2007).

2-4-2 La coloration de Gram :

La coloration de Gram a été mise au point par Christian Gram en 1884.

En effet, cette coloration complexe permet de différencier des bactéries intactes et morphologiquement semblables en deux groupes G⁺ et G⁻. Elle se base sur la couleur de la paroi cellulaire après avoir utilisé la méthode de la coloration. Les étapes de la coloration de Gram sont décrites dans l'annexe 1.

2-5 .Tests physiologiques

2-5-1 Voies fermentaire

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

Réaction de Voges-Proskaur (VP)

Le test de Voges Proskauer a été effectué pour différencier les organismes entériques tels que *E. coli*, *E. aérogènes* et *K. Pneumoniae* en déterminant la capacité des organismes à produire des produits finaux non acides ou neutres tels que acétylméthylcarbinol.

Un l'aliquote de bouillon MR-VP après 24 heures d'incubation, 0,6 ml (12 gouttes) d'alpha-naphtol à 5% (Le réactif A de Barrit) a été ajouté suivi de 0,2 ml (4 gouttes) de KOH à 40% (réactif B).

Le tube a été secoué doucement pour exposer le milieu à l'oxygène atmosphérique (30 secondes à 1 minute) et le milieu a été laissé au repos pendentif 10 à 15 minutes. Le test a été lu, mais pas au-delà, une heure après l'addition des réactifs (Faria *et all*, 2017)

Test au rouge de méthyle (MR)

Un test au rouge de méthyle a été effectué pour déterminer la capacité des bactéries à oxyder le glucose avec la production et stabilisation de haute concentration de produits finis acides.

En utilisant une technique stérile, une petite quantité de des bactéries de culture pure de 24 heures ont été inoculées dans les tubes contenant du bouillon MR-VP (7 ml) au moyen d'une boucle méthode d'inoculation avec une boucle d'inoculation et les tubes ont été incubés pendant 24 heures à 37 ° C.

Après 24 heures 3,5 ml des tubes de culture ont été transférés dans des tubes à essai propres pour le test Voges-Proskaur et le bouillon restant a été réincubé pendant 24 heures supplémentaires. Après 48 heures d'incubation, 5 gouttes d'indicateur de rouge de méthyle ont été ajoutées directement dans le aliquote restante des tubes de culture pour observer attentivement le développement immédiat d'une couleur rouge (Faria *et all*, 2017).

Production d'indole

Après incubation pendant 18 à 24 heures à 37 ° C, la colonie en tube a été observée pour la présence d'organismes mobiles. La production d'une couche de réactif rouge cerise après l'introduction du réactif de Kovac dans le milieu MIU indique un indicateur indole positif réaction (Faria *et all*, 2017).

Le milieu TSI (Triple Sugar Iron)

Ce test a été effectué pour différencier les différents groupes ou genres d'entérobactérie basé sur la capacité de réduire le soufre et de fermenter les glucides.

Les inclinaisons ont été préparées dans les tubes à essai par autoclavage. Une petite quantité de bactéries expérimentales provenant d'une culture pure de 24 heures a été inoculée dans les tubes au moyen d'une méthode d'inoculation par coup et stries avec une aiguille d'inoculation. Les bouchons à vis n'étaient pas complètement resserrés et les tubes ont été incubés pendant 24 heures à 37 ° C.

La fermentation est indiquée par le jaunissement de la crosse et de l'inclinaison du milieu gélosé Triple Sugar Iron (TSI). Si du gaz s'est formé pendant la fermentation, il est indiqué dans la crosse soit par la formation de bulles ou le craquage de la gélose (Faria *et all*, 2017).

Test d'utilisation du citrate

Ce test a été effectué pour différencier les organismes entériques en fonction de leur capacité à fermenter citrate comme seule source de carbone par l'enzyme citrate perméase.

Des inclinaisons de gélose au citrate Simmons de 2 ml dans chaque flacon ont été réparées par autoclavage à 15 psi 121 ° C. Une petite quantité de bactéries expérimentales de 24heures de culture

pure ont été inoculées dans les flacons au moyen d'une méthode d'inoculation par stries avec une aiguille d'inoculation et les flacons ont été incubés pendant 48 heures à 37 ° C. (Faria *et al*, 2017).

Après incubation, la culture positive au citrate a été reconnue par la présence de croissance à la surface de l'inclinaison de l'agar citrate de Simmons et coloration bleu de prusse profond du milieu (Faria *et al*, 2017).

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).

Test d'hydrolyse de la gélatine

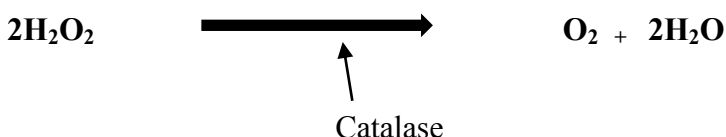
Ce test a été effectué pour détecter la capacité des bactéries à produire de la gélatinase. Tous les ingrédients du milieu nutritif de gélatine ont été mélangés et chauffés doucement pour se dissoudre. Trois millilitres du milieu a été distribué dans des flacons en verre et autoclavé. Le milieu tubulaire a été laissé refroidir en position verticale avant utilisation.

En utilisant une technique stérile, un inoculum lourd de bactéries de culture âgées de 24 heures a été inoculé dans les tubes avec une aiguille d'inoculation. Les flacons en verre ont ensuite été incubés à 37 ° C et observés jusqu'à 1 semaine (Faria *et al*, 2017).

2-6 Tests biochimiques

Test de catalase

Une lame microscopique a été placée à l'intérieur d'une boîte de Pétri. À l'aide d'une boucle d'inoculation stérile, une petite quantité du micro-organisme issu d'une culture pure de 24 heures a été placé sur la lame microscopique. 3% H₂O₂ solution a été ajoutée à chaque des lames et une partie de la colonie bactérienne a été mélangée.



La production de bulle a indiqué la présence d'enzyme catalase dans les bactéries (Faria *et al*, 2017).

Test d'oxydase

Une partie de la colonie a été ramassée avec un cure-dent et frottée sur une bande de papier filtre imprégné de réactive oxydase. Test d'oxydase indique positif par la présence de couleur violet foncé dans les 10 secondes (Faria *et al*, 2017).

Teste d'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).

Test d'hydrolyse de la caséine (plaque)

Après inoculation de l'organisme sur la plaque stérilisée soit en ligne droite soit en zigzag, il a été incubé à 25 ° ou 37 ° C pendant 24 heures. Pour le résultat, la plaque s'est soulevée vers la lumière pour voir les zones. Si le résultat est positif, des réactions peuvent être enregistrées comme réactions fortes ou faibles + ve. Une zone de défrichement autour de la zone de croissance identifie la présence de caséinase (Faria *et al*, 2017).

Hydrolyse de l'amidon

Le but du test d'hydrolyse de l'amidon était de vérifier si le micro-organisme peut utiliser l'amidon, comme source de carbone et énergie pour la croissance. L'utilisation de l'amidon est réalisée par une enzyme appelée α -amylase.

La plaque stérile inoculée de la gélose à l'amidon est incubée à 35-37 ° C pendant 48 heures. Un réactif à l'iode est ensuite ajouté pour accélérer la croissance.

Le réactif iode est ajouté après incubation pour inonder la surface de la plaque. Le compte-gouttes a été placé au-dessus de la plaque et ajoute le réactif à la culture. Les changements dans la plaque ont été surveillés. L'amidon dans la plaque a été changé en bleu-brun par le réactif iode.

Les zones où l'amidon a été traité par la croissance bactérienne affichent des halos clairs au milieu de la plaque sombre, démontrant un test positif d' α -amylase ou d'hydrolyse de l'amidon. Les plaques contenant des bactéries sans α -amylase était uniformément sombre (Faria *et al*, 2017).

Optimisation des processus pour une production maximale de cellulase

▪ **Température**

Le milieu de production à pH 7 a été inoculé avec une souche bactérienne sélectionnée cultivée pendant une nuit. Le bouillon a été incubé à différentes températures de 35, 40, 45, 50, 55 et 60°C pendant 24 h (Sethi *et al.*, 2013).

▪ **pH**

Des flacons contenant du bouillon contenant la concentration optimale de substrat et de source de carbone sont prélevés et le pH du bouillon est ajusté à 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 et 11,0 dans différents flacons

en utilisant 1 N HCl et 1 N NaOH et stérilisés. Les cultures sont inoculées et incubées à une température particulière. (Sethi *et al.*, 2013).

▪ **Source de carbone.**

L'effet de diverses sources de carbone comme l'amidon, le glucose, le maltose, le lactose et le fructose à la concentration de 1 à 5% a été examinée dans la production moyenne (Sethi *et al.*, 2013).

2-8 Identification moléculaire

L'ADN génomique a été isolé en utilisant la méthode du phénol chloroforme iso-amyle (PCI). L'isolement de l'ADN génomique était réalisé en deux étapes principales (Bhatt *et al.* 2012). L'ADN génomique a été visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose .

La région de l'ADNr 16S a été amplifiée par réaction en chaîne par polymérase en utilisant des amorces inverses. 2 µl d'ADN génomique ont été mélangés avec 48 µl de mélange PCR, la réaction finale mélange a été prélevé 50 µl. Pour l'amplification de la région d'ADNr 16S des isolats, l'amorce directe est complémentaire de l'extrémité 5' de l'ADNr 16S, et l'amorce inverse est complémentaire de l'extrémité 3' de la région d'ADNr 16S (Kena, *et al.* 2015).

Le mélange réactionnel de PCR a été préparé pour un total de 25 µl, qui consiste en 1,0 µl de sens direct et inverse. Amorces (10 mM), 2,5 µl de tampon Taq PCR avec MgCl₂, 2,5 µl de mélange dNTP (25 mM), 0,5 µl d'ADN polymérase Taq (3U / µl) et 1 µl d'ADN matrice (50 ng).

Les réglages du thermocycleur comprenaient une étape de dénaturation de 3 min à 94 °C suivie par 32 cycles de 94 °C pendant 40 s, 56 °C pendant 45 s et 72 °C pendant 75 s. Une dernière étape d'extension a été réalisée à 72 °C pendant 10 min (Kena, *et al.* 2015).

Le séquençage des produits amplifiés a été effectué par séquençage Sanger à Euro fins, (Bangalore).

En outre, la séquence générée était BLAST contre la base de données NCBI nr et recherchait la plus grande homologie pour l'identification de la séquence. L'arbre phylogénétique a été construit à l'aide de MEGA 6.0. Toutes les séquences sont soumises à Genbank NCBI.

Chapitre 3 :

Résultats et discussion

3-1 Isolement et criblage des bactéries productrices de cellulase

Douze isolats bactériens se sont révélés positifs lors de dépistage à l'aide de milieux spécifiques, à savoir le rumen.

Le Rouge-Congo permet la mise en évidence de l'activité cellulolytique par l'apparition de zones claires autour des colonies productrices de cellulase (Kena, *et all* 2015).

Après le test, les diamètres des zones d'hydrolyse pour chaque souche sont mesurés, ce qui permet de sélectionner la meilleure souche cellulolytique.

Le résultat a montré que la zone claire et la valeur de la capacité d'hydrolyse (HC) se situaient entre 5 et 33 mm et 1,3 à 3,7 respectivement pour tous les isolats (tableau 3).

Il a été observé que le CPB 1 a produit une plus grande quantité de cellulase suivi de CPB 4, CPB 2 et CPB 3. La plage de valeurs HC obtenue est similaire à la plage rapportée par Lu et al. Tandis que Hatami et al. Trouvé la valeur hydrolytique entre 1,38 à 2,33 et 0,15 à 1,37 de l'aérobie cellulolytiques isolats bactériens provenant respectivement du sol agricole et forestier (Kena, *et all* 2015).

Tableau 3. Valeur de la zone claire et de la capacité hydrolytique (HC) du CPB sur milieu CMC Congo rouge agar (Kena, *et all* 2015).

Sr. No	Taille totale (mm)	Taille de la colonie (mm)	Taille de la zone (mm)	Capacité d'hydrolyse
CPB 1	33	7	26	3.7
CPB 2	30	8	22	2.8
CPB 3	28	9	19	2.11
CPB 4	20	5	15	3.0
CPB 5	12	5	7	1.4
CPB 6	10	4	6	1.5

CPB 7	5	2	3	1.5
CPB 8	9	4	5	1.25
CPB 9	7	2	5	1.5
CPB 10	9	5	4	1.25
CPB 11	11	5	6	1.2
CPB 12	8	3	5	1.7

3-2 Test de sensibilité aux antibiotiques

Le diamètre des zones d'inhibition (tableau 4) a montré que tous les isolats ont une sensibilité à divers antibiotiques.

Le principal objectif du contrôle de l'activité antimicrobienne est le traitement de la maladie causée par ces organismes particuliers.

La moyenne des diamètres de la zone a été considérée. CPB-1, CPB-2, CPB-3 et CPB-4se sont avérés plus sensibles à la gentamycine, à la streptomycine, à la kanamycine et à la tétracycline respectivement et résistant respectivement à la lincomycine, au chloramphénicol, à la rifampicine et à la pénicilline G (Kena, *et all* 2015).

Tableau 4. Antibiogramme des isolats (Kena, *et all* 2015).

Isolat / Antibiotique	CPB-1	CPB-2	CPB-3	CPB-4
Amoxicilline AM10	-	-	-	30
Amikacin AK1	20	15	20	25
Streptomycine	22	22	20	29
Tétracycline TE10	15	7	5	35
Lincomycin L10	-	-	-	10

Pénicilline G P10	-	-	-	-
Rifampicine R5	18	6	-	6
Kanamycin K5	12	8	25	33
Oxytetracyclin O30	22	18	11	22
Oxacilline OX10	-	-	-	4
Chloramphénicol C10	-	-	12	13
Erythromycine E15	25	30	-	16
Gentamycine Gen10	28	18	18	32
Trimethoprim TR5	25	18	15	28

3-3 Cinétique de croissance des isolats

La cinétique de croissance des isolats a été étudiée en utilisant le modèle de la courbe de croissance. Cela signifie que les isolats entrent dans la phase de croissance après 2 heures et y restent jusqu'à 48 heures, après ils sont restés en phase stationnaire de 48 à 168 heures et enfin passer en phase de déclin (figure 4) (Kena, *et all* 2015).

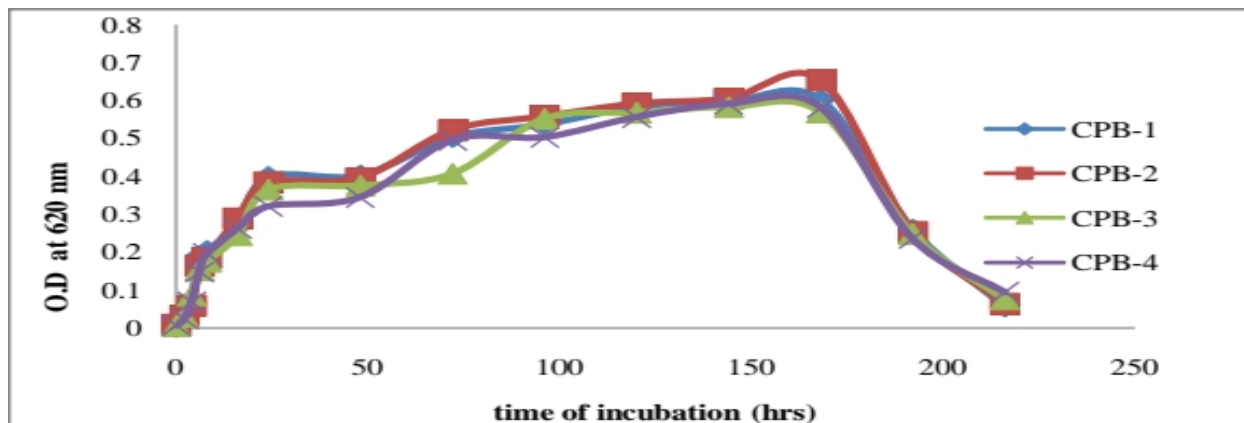


Figure 4. Etude de la cinétique de croissance des isolats (Kena, *et all* 2015).

3-4 Mesure de la production de cellulase

Des expériences ont été menées pour déterminer la capacité de production de cellulase de 4 isolats bactériens CPB 1, CPB 2, CPB 3 et CPB 4.

La capacité de production maximale de cellulase des isolats bactériens était du suivant ordre, CPB 2 (1,363 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{ml}$), CPB 1 (1,29 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{ml}$), CPB 3 (1,207 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{ml}$), CPB4 (1,119 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{ml}$) après 48 heures d'incubation. Leur efficacité de production de cellulase variait entre 1,2 et 1,4 $\text{umol} / \text{min} / \text{ml}$. Sur la base de ce test enzymatique, on peut conclure que les isolats font une maximum production à 48 heures qui est la phase stationnaire pour tous les isolats. Courbe standard de glucose pour l'enzyme cellulase l'activité est illustrée à la figure 5 (Kena, *et all* 2015).

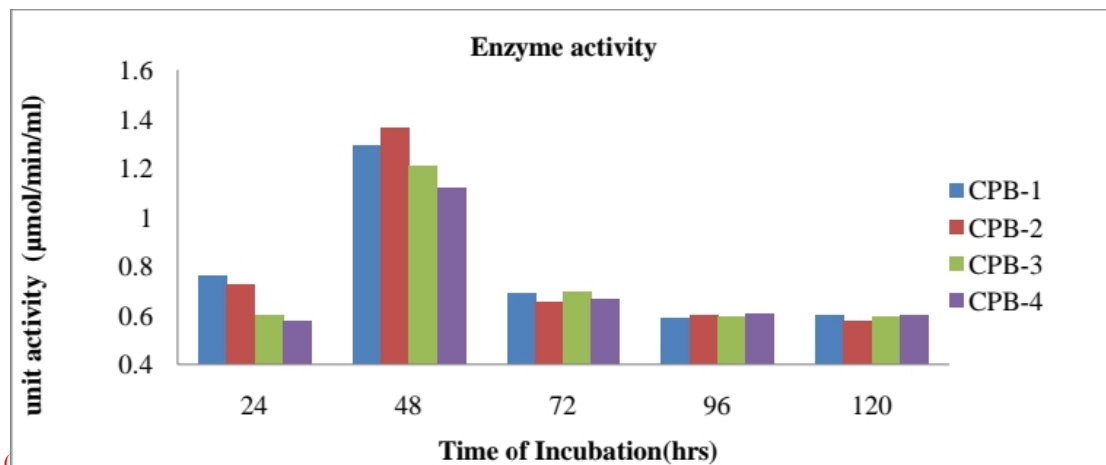


Figure 5. Capacité de production de cellulase des quatre isolats isolés du rumen (Kena, *et all* 2015).

3-5 Coloration de Gram des bactéries productrices de cellulase

Le résultat de la coloration de Gram était une morphologie telle que la taille, la forme et la disposition des bactéries. Des isolats de CPB-1 à CPB-4 ont été observés en forme de bâtonnets de couleur rose, ce qui permet de conclure qu'il s'agit de bacilles à Gram négatif (Kena, *et all* 2015).

Tableau 5. Tests physiologiques des isolats (Kena, *et all* 2015).

Tests	CPB-1	CPB-2	CPB-3	CPB-4
physiologiques				

Réaction de Voges-Proskaur (VP)	-ve	-ve	+ve	+ve
Test au rouge de méthyle (MR)	+ve	+ve	-ve	-ve
Production d'indole	-ve	-ve	+ve	+ve
Le milieu TSI (Triple Sugar Iron)	Rose-Rouge	Jaune	Jaune	Rouge
Test d'utilisation du citrate	+ve	-ve	+ve	+ve
Production de sulfure d'hydrogène	+ve	-ve	-ve	-ve
Test d'hydrolyse	-ve	-ve	-ve	+ve

la gélatine				
--------------------	--	--	--	--

Tableau 6. Tests biochimiques des isolats (Kena, *et all* 2015).

Test biochimique	CPB-1	CPB-2	CPB-3	CPB-4
Catalase	+ve	+ve	+ve	+ve
Oxydase	+ve	+ve	+ve	+ve
Uréase	+ve	-ve	-ve	-ve
Hydrolyse de caséine	+ve	-ve	+ve	+ve
Hydrolyse de l'amidon	-ve	+ve	-ve	+ve

+ve=Positive.

-ve=Négative.

3-6 Optimisation de l'activité enzymatique de la cellulase à différents pH, températures, Sources de carbone.

3-6-1 Températures

Tous les isolats ont la capacité de croître à différentes températures. Après une incubation de 48 heures, il a été trouvé que l'activité enzymatique cellulolique des isolats était maximale entre 40 ° C et 55 ° C et que l'optimum était de 40 ° C pour tous isolats, à 0 ° C et 28 ° C, la moindre production d'enzyme a été observée. Cellulase montrant une activité maximale dans la gamme de 40 ° C à 55 ° C se situe entre les plages normales de température dans le rumen (Tableau 7).

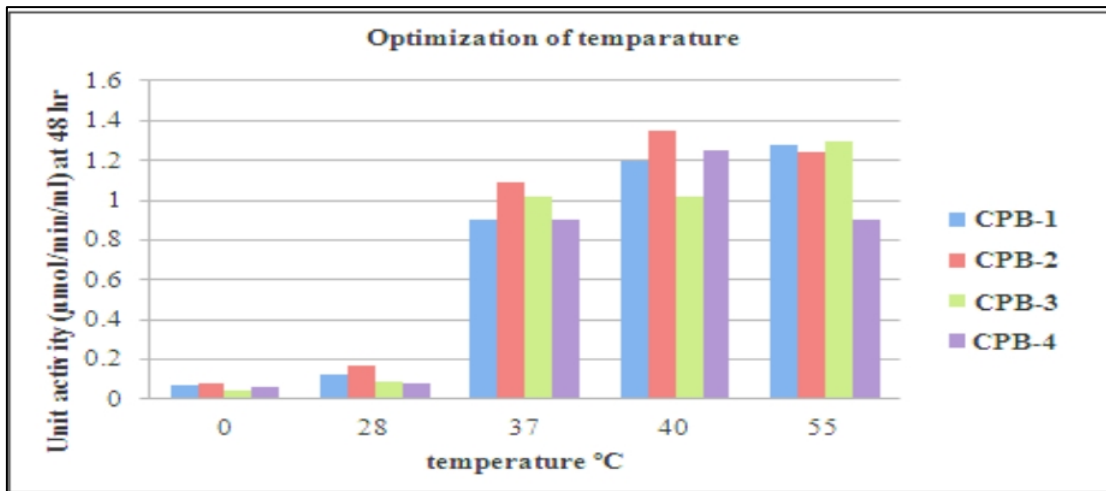


Tableau 7. Activité enzymatique de la cellulase à différentes températures

3-6-2 pH

L'activité enzymatique de la cellulase a été mesurée après 48 heures et il a été observé que tous avaient la capacité de croître à un pH différent.

Les résultats ont montré que les isolats peuvent produire un maximum de cellulase à 4 puis 7 pH. Production d'enzymes démunie observé à pH 2 alors que le pH optimal était de 4. En général, le rumen à un pH acide, donc l'optimum d'activité cellulase a été observée à pH 4 (figure 6) (Kena, *et all* 2015).

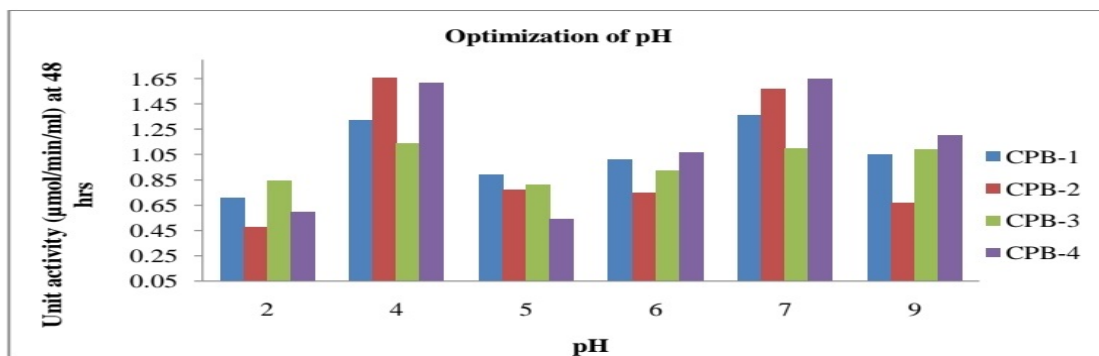


Figure 6. Activité enzymatique cellulase à différents pH (Kena, *et all* 2015).

3-6-3 Sources de carbonnes

L'ajout de différentes sources de carbone possèdent des effets à la fois positifs et négatifs sur la production de cellulase. La production maximale de cellulase a été obtenue avec du glucose (Cx 345,4 et C1 355,5 unités / ml) suivis de saccharose, fructose et xylose. Amidon, le galactose, le sorbitol, le mannitol et le lactose ont des effets négatifs sur la production de cellulase. Différentes concentrations de glucose (0,1 à 0,8%, p / v) ont également été étudiées sur la production de cellulase. Il a été

observé que 0,5% (p / v) donnait de meilleurs résultats dans la cellulase la production (Cx 575,9 et C1 605,5 U / ml) ainsi que la production de biomasse.

Quand la concentration de glucose a encore augmenté, l'activité de la cellulase a progressivement diminué. (Priyanka *et all.*2012).

3-7 Identification moléculaire

L'isolement de l'ADN génomique a été effectué par la méthode PCI, l'ADN obtenu a été utilisé pour l'amplification de l'ADNr 16S. Après isolement de l'ADN, la région de l'ADNr 16S a été amplifiée par PCR, 5 µl de produits PCR ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à la lumière UV. Le produit amplifié de 1500 pb a été observé dans tous les échantillons (figure 7).

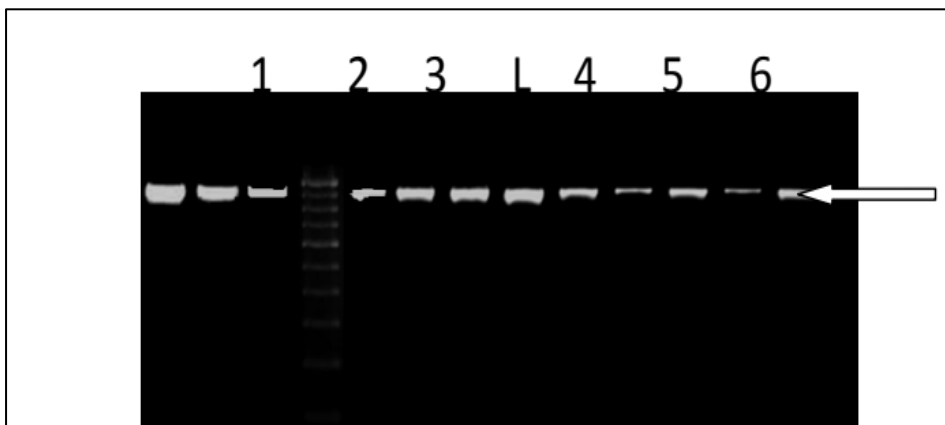


Figure 7 . Visualisation des produits amplifiés par PCR par électrophorèse sur gel d'agarose (Kena, *et all* 2015).

3-8 Séquençage d'ADN

La séquence résultante du séquençage du Sangar était rapportée à la base de données NCBI nr (tableau 8). (Kena, *et all* 2015).

L'arbre phylogénétique a été généré en utilisant MEGA Version 6.5 des séquences résultantes du rumen de bovin et séquences signalées présentes dans la base de données NCBI. Tous les 4 isolats forment des lignes distinctes, puis celles rapportées.

De plus, toutes les séquences d'isolats forment un groupe dans l'arbre phylogénétique indiquant qu'elles sont étroitement liées (Figure 8).

Tableau 8. Identification de l'organisme (Kena, *et all* 2015).

Sr No.	Code d'isolat	Nom de l'organisme
1	CPB1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
2	CPB2	<i>Sphingobacterium alimentarium</i>
3	CPB3	<i>Serratia marcescens</i>
4	CPB4	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>

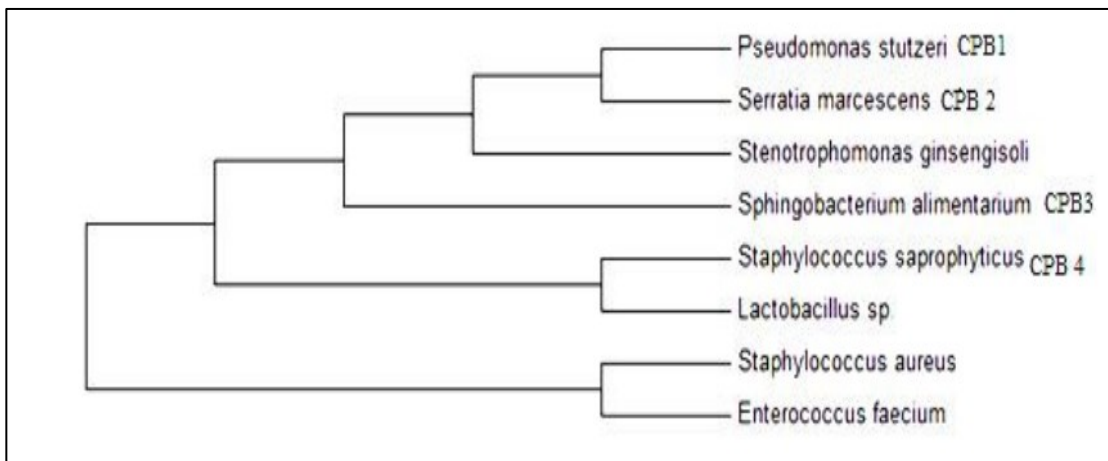


Figure 8. Arbre phylogénétique (Kena, *et all* 2015).

Conclusion

Les bovins ont quatre compartiments gastriques pour digérer leur nourriture. Parmi eux, le rumen est le plus grand compartiment, et il peut contenir jusqu'à 50 gallons de nourriture et d'autres substances ingérées. La chose la plus importante à propos du rumen, c'est qu'il contient une énorme quantité de microbes différents, y compris des bactéries, des champignons, des protozoaires et autres.

Dans cette étude, les efforts ont été faits pour l'exploitation d'une nouvelle source d'isolements de microorganismes producteurs de cellulase de mammifères comme le bovin

Au total, 12 bactéries ont été isolées, dont quatre avec cellulolytiques optimums. La caractérisation morphologique et physiologique des isolats a été effectuée.

Pour révéler l'activité cellulosique des organismes, diamètre de la zone claire autour de la colonie sur gélose au rouge Congo ont été mesurées. Le rouge-congo permet la mise en évidence de l'activité cellulolytique par l'apparition de zones claires autour des colonies productrices de cellulase.

L'activité cellulosique de tous les isolats a été étudiée et il a été constaté que CPB2 donne plus d'activité suivi de CPB1, CPB3 puis CPB4. Il a été constaté qu'après 48 heures d'incubation dans un milieu CMC spécifique du rumen à 37 ° C, avec l'isolât CPB2 de pH 4 a donné une activité maximale suivie de CPB1, CPB3 et ensuite CPB4.

Après une incubation de 48 heures, il a été trouvé que l'activité enzymatique cellulosique des isolats était maximale entre 40 ° C et 55 ° C et que l'optimum était de 40 ° C pour tous isolats,

Amplification du gène ARN16s, les isolats ont été identifiés comme CPB1- *Pseudomonas stutzeri*, CPB2- *Sphingobacterium alimentarium* et CPB3- *Serratia marcescens* et CPB4-*Staphylococcus saprophyticus*.

Bibliographie

A

Aziza .Ma ,(perspectives du développements de la bioénergie en Algérie)Centre de Développement des Energies Renouvelable Ministère de ,l'Enseignement Supérieur de La Recherche scientifique ,Bulletin des Energies Renouvelable,N° 17 ,pp.14 ,2010.

B

Baumgartner J.G.(1949).Canned foods :an introduction to their microbiology,ed 278 .J and A Churchil LTD London.

Béguin P.,Aubert J.P. (1994) .The biological degradation of cellulose ,FEMS ,Microbiol.Rev. 13p :25-58.

Bisaria , V.S .,Chose ,S.N.(1960) .Biodégradation of cellulosic materials,Substrates Microorganisms,enzymes and production enzymes,Microb .Technol .3,p :90-104 .

Brännvall, E. Aspect on Strength Delivery and Higher Utilisation of Strength Potential of Soft Wood Kraft Pulp Fibres. Ph.D. Thesis, KTH, Royal Institute of Technology: Stockholm, Sweden, 2007.

BAYER, E.A, R KENIG and R LAMED. 1983. J. Bacteria1. 156 : 818-827.

LAMED) R) E. SETTER) R KEN 1Gand E.ABAYER 1983 b. Biotechnol. Bioengin. Symp. 13: 163-181.

C

Capitant J. F. 1968. La Carboxymethyl cellulose de Sodium. Port. Quinn 10 (91): 91-98

Cho S.,Devries J.W.,Prosky L. (1997) .Dietary Fiber Analysis and Application.Gaithersburg ,MD :AOAC International.

D

Denis F., Poly M .C., Martin C., Bingen E., Quentin R. 2007. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Elsevier Masson, Paris, France. pp257.

Dufresne, A. Polymer nanocomposites from Biological Sources. In Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, 2nd ed.; Nalwa, H.S., Ed.; American Scientific Publisher: Valencia, CA, USA; in press .

E

Eloutassi, N., Louaste, B., Boudine, L., & Remmal, A. (2014). Valorisation de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol de deuxième génération. Revue des Energies Renouvelables 17(4) : 600-609.

F

Faria Y. Aditi, Shafkat S. Rahman and Md. M. Hossain A Study on the Microbiological Status of Mineral Drinking Water ,2017Fengel, D., Wegener, G. 1983. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter.

Fengel, D., Wegener, G. 1983. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter.

H

HASPER A, A.,DEKKERS E., MILL M.V .,VAN DE VONDERVOORT P .J.I .,DE GRAAFF L.H(2002) .Egl C ,a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with majort activity towardsxylogllucan .App.Environ .Microbiol .68(4) .P :1556-1560.

I

Isolation of Cellulose Degrading Bacteria from Rumen and Evaluation of Cellulase Production Potential Using Lignocellulosic Substrate Olyad Erba Urgessa* , Yimeslal Atnafu Sima, Ameha Kebede, Mahafuz Mohammed 2020).

Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential Pratima Gupta,1 Kalpana Samant,2 and Avinash Sahu2 2012).

Isolation and Characterization of Cellulase Producing Bacteria from Rumen Fluid Kena Patel1 , Yati Vaidya1 , Shriram Patel1 , Chaitanya Joshi2 , Anju Kunjadia1*2015).

J

John, M.J.; Thomas, S. Biofibres and biocomposites. *Carbohydr. Polym.* 2008, 71, 343-364.

Jeannette TCHUNDEN : Cellulolyse Anaérobie Mésophile :Etude de l'amélioration de la production de cellulases par *Cl. ATCC 35 31 9* .1990).

JOHNSON) E.A) M. SAKAJON) G. HALLIWELL) AMADIA and AL. DEMAINE. 1982. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 : 1125-1132.

K

KHALEF.A. (2009) .Etude des Etapes Primaires de la Dégradation Thermique de la Biomasse Lignocellulosique, Doctorat d'Etat, Université Paul Verlaine, Metz, France.

L

Lakhundi S., Siddiqui R., Khan N.A. 2015. Cellulose degradation: a therapeutic.

LARANT.P., ROIZ .J., WERT .J.L., RICHEL.A., PAQUOT.M.(2011) .Le Bioraffinage ,une Alternative Prometteuse à la Pétrochimie, Biotechnologie, Agronomie , Société et Environnement , Vol. 15, N°4, pp .597-610.

Lin j .S., Tang M.Y., Felleres J.F.(1987) .Fractal analysis of cotton cellulose as Characterized by small-angle X-ray scattering .ACS.Symp .Ser.340 .p :233-254 .

M

Mandels M. Applications of cellulases. Biochem Soc Trans. 1985;13:414-416.

MARGEOT.M et MONOT.F. (2009) Procédés de Production d'Alcool dans un Contexte de Bio Raffinerie .Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle, WO 2009/098365 A2

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

Mouranche .A., et Costes .C. (1985) .Hydrolyse et dépolymérisation enzymes d'intérêt industriel.Gauthier-Villars (ed) .

P

PERRY .J.J., STALE.JT. LORY .S, (2004) .Microbiologie, cours et questions de révision .Dunod .Paris.497-850 .

Privvas, E.2013 .Matériau ligno-cellulosique :''Elaboration et caractérisation'' (Doctoral dissertation, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris).

P Béguin,JP Aubert-FEMS microbiology reviews ,1994 the biological degradation of cellulose.

R

R. J. Dillon and V. M. Dillon, "The gut bacteria of insects non-pathogenic interaction," Annual Review of Entomology, vol. 49, pp. 71–92, 2004.

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

O

Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil Sonia Sethi, Aparna Datta, B. Lal Gupta, and Saksham Gupta 2013).

S

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

Strategy in the improved treatment of Acanthamoeba infections. Parasit vectors. 8 :2-3.

Sun R.2010.Cereal straw as a source for sustainable biomaterials and biofuels :chemistry extractives ,lignins,hemicellulose and cellulose .Esevier.

T

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

V

Vidaud .C. (1984) .Contribution à l'étude de l'introduction du système.

Z

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, Université de Toulouse.

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

Annexes

Annexe 1 :

Les étapes de la coloration de Gram sont décrites dans l'annexe 2.

Classiquement la technique du « Gram » comporte les étapes successives suivantes :

Coloration avec le violet de gentiane

Recouvrir le frottis par le violet de gentiane et laisser agir une minute.

Rejeter le colorant en excès et laver à l'eau.

Mordançage au lugol

Recouvrir la préparation de lugol et laisser agir une minute.

Rejeter le lugol et laver à l'eau.

- **Décoloration à l'alcool**

Décolorer à l'alcool à 95° ou au mélange alcool-acétone, lames inclinées à 45°. C'est le temps critique de la manipulation car la durée de décoloration doit s'adapter à l'épaisseur du frottis. En pratique il convient d'arrêter la différenciation dès que les « volutes » de violet s'interrompent.

Coloration avec la fuchsine

Recouvrir la lame de la solution de fuchsine diluée et laisser agir 20 secondes.

Rejeter la fuchsine en excès et laver à l'eau.

Sécher la lame à l'air chaud ou entre deux feuilles de papierfiltre ou buvard très propres.

Examiner au microscope (objectif à immersion) au grossissement X 1 000. Les bactéries Gram positives sont colorées en violet, les Gram négatives en rose rouge.

Résumé

Douze bactéries productrices de cellulase (CPB) ont été isolées à partir de liquides de rumen de bovins, en enrichissant du rumen dans milieu spécifique contenant du CMC (Carboxy Méthyl Cellulose) comme substrat pour la dégradation de la cellulose. Pour indiquer l'activité cellulase des organismes, diamètre de la zone claire autour de la colonie sur gélose au rouge Congo ont été mesurées. Isoler CPB 1 et CPB4 présentait la zone de dégagement maximale autour de la colonie.

Alors que pour tous les isolats, la zone de clairance et la capacité d'hydrolyse(HC) ont été trouvés entre 5 à 33 mm et 1,3 à 3,7 respectivement. Le dosage enzymatique de la cellulase a été réalisé avec Miller. 1,3 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{ml}$. Les activités de la cellulase extracellulaire allaient de 0,6 à 1,3 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{ml}$

Toutes les cultures ont été testées pour leur capacité pour dégrader la CMC à divers pH, température et la source de carbone. Le CPB maximal a été estimé à CPB 2. Pour les isolats CPB 1-4 Cinétique de croissance.

Mots clés : liquides de rumen, CMC, cellulase.

Abstract

Twelve cellulose producing bacteria (CPB) were isolated from rumen fluids of cattle, by enriching the rumen in specific medium containing CMC (Carboxy Methyl Cellulose) as a substrate for cellulose degradation. To indicate the cellulase activity of the organisms, diameter of the clear area around the colony on Congo red agar was measured. Isolate CPB 1 and CPB4 exhibited the maximum clearance area around the colony.

While for all isolates, area of clearance and hydrolysis capacity (HC) were found between 5 to 33 mm and 1.3 to 3.7 respectively. The enzymatic assay of cellulase was carried out with Miller. 1.3 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{ml}$. Extracellular cellulase activities ranged from 0.6 to 1.3 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{ml}$

All cultures were tested for their ability to degrade CMC at various pH, temperature and carbon source. The maximum CPB was estimated to be CPB 2. For isolates CPB 1-4 Growth kinetics.

Key word: rumen fluids of cattle, CMC, cellulase.

على تم عزل اثني عشر بكتيريا منتجة للسليلاز من سوائل الكرش للماشية ، عن طريق إثراء الكرش في وسط معين يحتوي على كركيزة لتحلل السليولوز. للإشارة إلى نشاط السليلاز للكائنات الحية ، تم قياس قطر المنطقة الصافية حول المستعمرة على أجار الكونغو الأحمر. أظهر عزل و أقصى مساحة خلوص حول المستعمرة. بالنسبة لجميع العزلات وجدت مساحة التصفية وقدرة التحلل المائي (بين 5-33 ملم و 1.3 إلى 3.7 على التوالي تم إجراء الى الفحص الأنزيمي للسليولاز مع ميلر 1.3 ميكرو / دقيقة / مل. تراوحت أنشطة السليلاز خارج الخلية من 0.6 إلى 1.3 ميكرو مول / دقيقة / مل تم اختبار جميع الثقافات لقدرتها على تحلل في درجات الحموضة المختلفة ودرجة الحرارة ومصدر الكربون. تم تقدير الحد الأقصى لكون بنسبة للعزلات 1-4 حركية النمو

