



République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريش  
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi - B.B.A -

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers  
قسم العلوم البيولوجية

Départements des Sciences Biologiques



# Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Spécialité: Microbiologie Appliquée

Intitulé

**Activités enzymatiques des bactéries  
isolées à partir des sols riches en  
matières organiques en décomposition**

Présenté par:

M<sup>lle</sup> AOUINTI Imane

M<sup>lle</sup> BACHENE Meriem

Devant le jury :

**Président :** M<sup>m</sup> SAID Lamria MCA (Univ Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A)

**Encadrant :** M<sup>m</sup> SADRATI Nouari MAA (Univ Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A)

**Examineur :** M<sup>t</sup> SOUAGUI Yasmina MCA (Univ Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A)

Année universitaire : 2018/2019

## *Remerciements*

*Mon Dieu*

*" Gloire à Toi ! Nous n'avons de savoir que ce que Tu nous a appris"*

*Louange à Dieu, notre créateur  
de nos avoir donné les forces, la volonté et le courage  
afin d'accomplir ce travail modeste.*

*Nous adressons le grand remerciement à notre encadreur  
qui a proposé le thème de ce mémoire,  
pour ses conseils et ses dirigés du début à la fin de ce travail.  
Nous demandons à Dieu de réconcilier son permanent.*

*Finalement, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude  
à tout ce qui participe de réaliser cette mémoire.*

*Dédicace*

*Je dédier cette mémoire à*

*L'homme le plus cher du monde, mon père rahimahou Allah*

*La femme la plus chère au monde, ma mère*

*Mes frères et mes sœurs*

*l'âme sœur linda*

*Rahim*

*Mes amis à l'université*

*Meriem*



## الملخص

تطرق عملنا إلى دراسة البكتيريا المعزولة من التربة الغنية بالمادة العضوية المتحللة والتي أخذت من منطقتي (القليعة، غيلاسة) من ولاية برج بوعرييج خلال شهر ماي 2019 . حيث تم التركيز على إظهار قدرتهم على إنتاج بعض الإنزيمات (البروتياز، السبيلوز، الأميلاز، الاستراز والليباز). 110 عزلة مختلفة عزلت: 66 عزلة من تربة 1 و44 عزلة من تربة 2 ومنهما تم عزل *Pseudomonas spp* 40 . وقد أظهرت نتائجنا أن 103 عزلة لديها نشاط إنزيمي على الأقل، مما يوضح أهمية هذه الأخيرة، 07 عزلات لا يمكنها إنتاج إنزيم (عزلات غير نشطة). الكازيبيناس هو الإنزيم الأكثر إنتاجا الذي أنتجته العزلات (80 %)، يليه كاربوكسيميثيل سيلولاز (73.63 %) والليباز (35.45%) حيث يعد كل من الأميلاز و Tween 80 الأقل تفككا من بين جميع مواد التفاعل بنسبة 0.91%. من بين هذه العزلات عرضت 5 عزلات افضل المؤشرات الانزيمية ( P-1-10, E-1-41, E-2-21, E-2-22, و E-2-24) والتي تتمثل في (الكازيبيناس, كاربوكسيميثيل سيلولاز, الأميلاز, الاستراز والليباز) .

**الكلمات المفتاحية:** *Pseudomonas spp*, نشاط إنزيمي , كاربوكسيميثيل سيلولاز , مؤشر إنزيمي, عزلة.

## Résumé

Notre travail s'est intéressé à l'étude des bactéries isolées à partir du sol riche en matière organique en décomposition. Prélevée de deux régions (Goléa, Ghailasa) de la wilaya de Bordj Bou Arreridj pendant le mois de Mai 2019, et a porté sur la mise en évidence de leur aptitude à produire quelques enzymes (protéase, cellulase, amylase, estérase, et lipase). 110 colonies différentes sont isolées et purifiées: 66 à partir du sol 1 et 40 à partir du sol 2 dont 40 isolats sont des *Pseudomonas* spp.. Nos résultats ont démontré que 103 souches ont montré au moins une activité enzymatique, ce qui démontre leur importance avec 07 Isolats n'a pu produire d'enzyme (des isolats non active). La caséinase est l'enzyme la plus produite par nos souches (80 %), suivie par la carboxyméthylcellulase (CMCase) (73.63 %) puis la lipase (35.45 %); L'amylase et le Tween 80 sont les substrats les moins dégradé de tous les substrats avec un pourcentage de 0.91%. Cinq isolats (E-2-22, E-2-21, E-1-41, P-1-10 et E-2-24) ont démontré les meilleurs indices enzymatiques, elles sont considérées comme productrices des enzymes (la caséinase, la carboxyméthylcellulase, l'amylase, l'estérase et la lipase).

**Mots clés:** *Pseudomonas* spp, Activité enzymatique, Carboxyméthylcellulase, isolat, Indices enzymatiques.

## **Abstract**

Our work has focused on the study of bacteria isolated from soil rich in decomposing organic matter. Taken from two regions (Goléa, Ghailasa) of the Bou Arreridj bordj wilaya during May 2019, and focused on demonstrating their ability to produce some enzymes (protease, cellulase, amylase, esterase and lipase). 110 different colonies are isolated and purified: 66 from soil 1 and 40 from soil 2 of which 44 isolates are *Pseudomonas* spp.. Our results have shown that 103 strains showed at least one enzyme activity, demonstrating their importance with 07 Isolates could not produce an enzyme (non-active isolates). Caseinase is the most common enzyme produced by our strains (80%), followed by carboxymethylcellulase (Cmcase) (73.63%) and lipase (35.45%). Amylase and Tween 80 are the least degraded substrates of all substrates with a percentage of 0.91%. Five isolates demonstrated the best enzymatic indices: (E-2-22, E-2-21, E-1-41, P-1-10 and E-2-24) (caseinase, carboxymethylcellulase, amylase, esterase and lipase).

Key words: *Pseudomonas* spp., enzyme activity, carboxymethylcellulase, enzymatic indices, isolates

## Liste des abréviations

**BN:** Bouillon Nutritif  
**CMC:** Carboxyméthylcellulose  
**CMCase:** Carboxyméthylcellulase  
**cm:** Centimètre  
**E:** Enzyme  
**EC:** Enzyme commission  
**g:** Gramme  
**GN:** Gélose nutritive  
**h:** Heur  
**IE:** Indice enzymatique  
**I.U.B:** International Union of Biochemistry  
**kDa:** kilodalton  
**m:** Mètre  
**m<sup>2</sup>:** Mètre cube  
**min:** Minute  
**ml:** Millilitre  
**mm:** Millimètre  
**O<sub>2</sub>:** Dioxygène  
**PCA:** Plate Count Agar  
**PGPR:** Plant Growth Promoting Rhizobacteria  
**pH:** Potentiel d'hydrogène  
**m/v:** masse par volume.  
**tween 20:** Polysorbate 20  
**tween 80:** Polysorbate 80  
**T (°C):** Température en degré Celsius  
**UFC:** unité formant colonie  
**UI:** Unité internationale  
**v/v:** Volume par volume.  
**µm:** Micromètre

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Proportion des principaux composants du sol en volume (White, 2006).....	3
<b>Figure 02:</b> Distribution des microorganismes dans le sol (Gobat et al, 2003).....	5
<b>Figure 03:</b> Site de collecte de l'échantillon de sol 1 dans la région de Goléa.....	23
<b>Figure 04:</b> Site de collecte de l'échantillon de sol 2 dans la région de Ghailasa.....	23
<b>Figure 05:</b> Les étapes de prélèvement des échantillons.....	(Annexe)
<b>Figure 06:</b> Quelques aspects des colonies obtenues sur PCA, GN, king A et king B à partir du sol.....	27
<b>Figure 07:</b> Photographies représentant le résultat de purification de certains isolats sur GN, king A et king B.....	28
<b>Figure 08:</b> Conservation des isolats obtenues à partir du sol en milieu liquide (bouillon nutritif).....	29
<b>Figure 09:</b> Photographies représentant le résultat positif et négatif de l'activité caséinolytique de certains isolats du sol de Goléa.....	30
<b>Figure 10:</b> Photographies représentant le résultat positif et négatif de l'activité carboxyméthylcellulosique de certains isolats du sol de Goléa.....	31
<b>Figure 11:</b> Photographies représentant le résultat positif de l'activité amylolytique de l'isolat (E-1-41) et le résultat négatif de certains isolats du sol de Goléa.....	31
<b>Figure 12:</b> Photographies représentant le résultat positif de l'activité estérasique de la souche (P-1-10) et négatif pour d'autres isolats du sol de Goléa.....	32
<b>Figure 13:</b> Photographies représentant le résultat positif et négatif de l'activité lipolytique des isolats du sol de Goléa.....	32
<b>Figure 14:</b> Photographie représente le résultat positif de l'activité caséinolytique de certains isolats isolés du sol de Ghailasa.....	33
<b>Figure 15:</b> Photographies représentant le résultat positif de l'activité carboxyméthylcellulosique pour les bactéries isolées du sol de Ghailasa.....	34
<b>Figure 16:</b> Photographie représente le résultat négatif de l'activité estérasique de certains isolats du sol de Ghailasa.....	34
<b>Figure 17:</b> Photographies représentant le résultat positif et négatif de l'activité lipolytique pour les bactéries isolées du sol de Ghailasa.....	35
<b>Figure 18:</b> Histogramme représentant la répartition des bactéries isolées du sol 1 selon la nature du substrat dégradé (Goléa).....	36

<b>Figure 19:</b> Histogramme représentant la répartition des bactéries isolées du sol 2 selon la nature du substrat dégradé (Ghailasa).....	36
<b>Figure 20:</b> Histogramme représentant la répartition des bactéries ( <i>Pseudomonas</i> spp.) de l'échantillon selon le nombre des enzymes produites.....	38
<b>Figure 21:</b> Histogramme représentant la répartition des bactéries ( <i>Pseudomonas</i> spp.) de l'échantillon 2 selon le nombre des enzymes produites.....	38
<b>Figure 22:</b> Histogramme représentant la répartition des bactéries isolées de l'échantillon 1 selon le nombre des enzymes produites.....	39
<b>Figure 23:</b> Histogramme représentant la répartition des bactéries isolées de l'échantillon 2 selon le nombre des enzymes produites.....	40
<b>Figure 24:</b> Histogramme représentant la répartition des bactéries isolées du sol selon l'indice enzymatique (Goléa, Ghailasa).....	44
<b>Figure 25:</b> Histogramme représentant la répartition des <i>Pseudomonas</i> spp. isolées du sol selon l'indice enzymatique (Goléa, Ghailasa).....	45

## Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Représente le matériel utilisé dans cette étude.....	(Annexe)
<b>Tableau II :</b> Les grands groupes des microorganismes du sol (Roger, Garcia, 2001).....	4
<b>Tableau III:</b> Classification des enzymes (Vincent et <i>al.</i> , 1996).....	7
<b>Tableau IV:</b> Microorganismes producteurs de protéase.....	10
<b>Tableau V:</b> Origine des échantillons du sol et leurs aspects.....	23
<b>Tableau VI:</b> Dénombrement de la flore tellurique en UFC/g dans les échantillons du sol.....	28
<b>Tableau VII:</b> Les Indices enzymatiques des bactéries (flore totale) isolés du sol 1 (Goléa).....	41
<b>Tableau VIII:</b> Les Indices enzymatiques des bactéries (flore totale) isolés du sol 2 (Ghailasa).....	42
<b>Tableau IX:</b> Les indices enzymatiques des <i>Pseudomonas</i> sp. isolés du sol 1 (Goléa).....	43
<b>Tableau X:</b> Les indices enzymatiques des <i>Pseudomonas</i> sp. isolés du sol 2 (Ghailasa).....	43

# Introduction

---

Dans le sol, les microorganismes représentent la majorité des organismes vivants et constituent une importante part de la diversité génétique de la planète. Il a été estimé qu'un gramme de sol contenait de  $10^{10}$  à  $10^{11}$  bactéries, de 6000 à 50000 espèces bactériennes (**Mezzache et al., 2012**).

Le sol est une unité vivante, intègre des propriétés biochimiques et biologiques qui sont liées principalement aux activités microbiennes du sol, ces population sont de remarquables agents de dégradation. En effet, dans leur environnement naturel, ils participent à la biodégradation de la matière organique même la plus complexe comme la cellulose, la lignine, la chitine, la pectine et le xylane...etc, présentes ou ajoutées dans le sol.

Les micro-organismes (bactéries et champignons) sont la principale source d'enzymes dans le sol. Au cours des dernières décennies, les enzymes sont devenues une star des paillasses en Biotechnologies; il convient de souligner que la forte présence de ces biocatalyseurs résulte de l'intérêt économique qu'elles présentent dans les différents secteurs de bioindustries (**Belhadi et Ait Meddour, 2013**).

Aujourd'hui, près de 4000 enzymes sont caractérisées, et parmi celles-ci presque 200 sont commercialisées pour usage industriel, à l'heure actuelle, seulement quelques 2% environ des microorganismes dans le monde ont été testés comme sources d'enzymes et des taux de manipulation génétique ou environnementales sont continuellement menés avec les souches microbiennes déjà répertoriées et classées GRAS (Generally Reconized As Safe) afin d'augmenter le rendement des cellules ou la qualité des enzymes produites. Cependant, le monde microbien regorge de potentialités catalytique et les travaux de criblage (screening) de nouvelles activités n'en demeure pas moins une alternative valable et certainement plus accessible (**Dari et al., 2013**).

De très nombreuses activités enzymatiques peuvent être décelées dans le sol: hydrolases, oxydoréductase, transférases, lyases, il s'agit donc des amylases, arylsulfatases,  $\beta$ -glucosidase, cellulases, chitinases, déshydrogénases, phosphatases, protéases et des uréases libérées dans cette matrice. Ces enzymes jouent un rôle clé dans le processus global de la décomposition de la matière organique dans les écosystèmes (**Petit et Jobin, 2005**) en raison de leurs liens évidents avec les grands cycles biogéochimiques, elles sont synthétisées, accumulées, inactivées et/ou constamment décomposées dans le sol, selon l'environnement physico-chimique.

# Introduction

---

A cet effet, on a tenté d'isoler et purifier des bactéries du sol à partir de deux régions de la wilaya de Bordj Bou Arreridj, ces bactéries sont sélectionnées sur la base de la production d'enzymes d'intérêt industriel.

La méthode de ce travail est comme par suite:

- Isolement et purification des bactéries à partir des sols riches en matière organiques en décomposition.
- La mise en évidence des activités enzymatiques (protéase, cellulase, amylase, estérase et lipase).

# **Partie I**

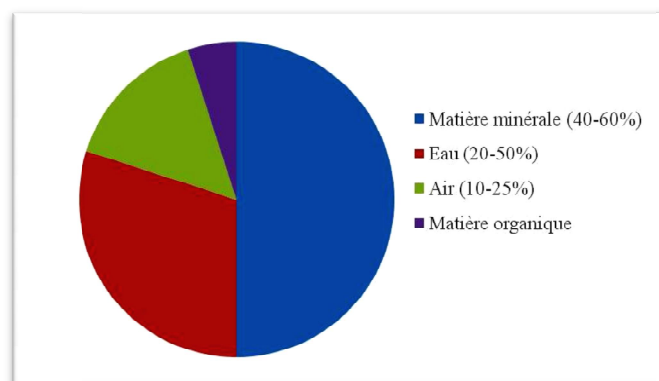
## **Synthèse bibliographique**

La microbiologie des sols a pour but l'étude des microorganismes proliférant dans le sol en utilisant un groupe de techniques qui visent à estimer les microorganismes, à les isoler et à étudier leurs activités (**Pochon et Tchan, 1948**).

## I.1 Sole et bactéries

### I.1.1 Le sol et ses composants

Point de rencontre du monde végétal, animal et minéral, le sol est la base d'un cycle de vie sur notre planète, c'est un milieu vivant où se développe une activité biologique très intense (**Belhadi et Meddour, 2012**). Le sol est à l'interface entre la lithosphère, l'atmosphère et l'hydrosphère et sert de support à une partie de la biosphère (**Duponnois et al., 2013**), il est constitué de cinq composants majeurs: fraction minérale, matière organique, eau, air et organismes vivants (Figure 1). Les matières organiques et minérales s'organisent de manière à créer des vides alors occupés par l'air et l'eau (**Faugier, 2010**).



**Figure 1:** Proportion des principaux composants du sol (White, 2006).

### I.1.2 La distribution des microorganismes

L'importance de la variabilité spatiale en écologie microbienne du sol a depuis longtemps été reconnue et la distribution spatiale des microbes a été décrite à des échelles allant de quelques millimètres à plusieurs mètres (**Faugier, 2010**), où la couche superficielle du sol, mieux aérée et plus riche en substances nutritives et riches en microorganismes et que leur nombre diminue progressivement avec la profondeur (**Dari, 2013**).

## I.1.3 Microflore du sol

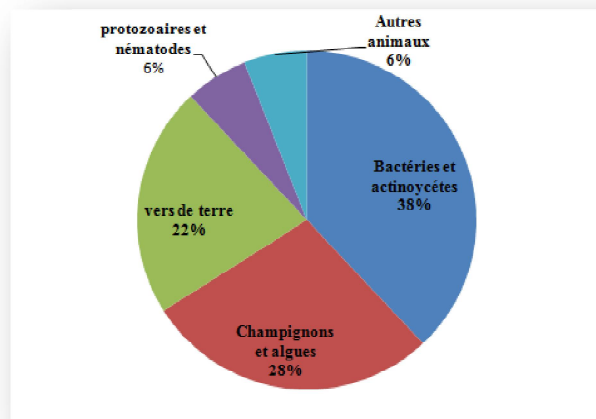
Les organismes vivant du sol sont des bactéries, des champignons et des algues (les différentes groupes sont montrées dans le tableau II et la figure 2). Tous participent d'une manière ou d'une autre à la formation et à l'évolution de sol (Gobat et al, 2003). Les microorganismes du sol, jouent un rôle fondamental dans les processus importants comme; la régulation des cycles biogéochimiques (Dari, 2013).

**Tableau II:** Les grands groupes des microorganismes du sol (Roger et Garcia, 2001)

Grands groupes	Taxons considérés comme importants dans le sol
Bactéries	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Bacillus</i>
	Protistes inférieures
Actinomycètes	Mycobactériacées
	Actinomycétacées (ou Proactinomycètes)
	Streptomycétacées
Champignons	Moisissures à plasmodium
	Champignons à flagelle
	Zygomycètes
Algues	Algues vertes
	Eugléniens
	Algues jaunes, Diatomées

Les bactéries représentent l'un des plus grands groupes de microorganismes présents dans le sol, elles sont classées en bactéries autotrophes (utilisation du carbone sous forme minéral) et bactéries hétérotrophes (utilisation du carbone sous forme organique). Elles prolifèrent dans les milieux les plus riches en azote, peu acides, aéré et à pH supérieur à 6. Alors que la couche superficielle contient au moins 80% de bactéries d'actinomycétales par rapport au nombre totale de microorganismes, la couche située à une profondeur de 80 cm n'en contient plus que 14 à 16 % (Maidoukia et al., 2014).

D'autres bactéries sont associées aux racines, Les *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes, ce sont les habitants type des sols agricoles et la rhizosphère des plantes et sont impliqués dans de nombreuses interactions avec les plantes. Ces bactéries sont considérées comme des composés biologiques du sol agricole et sont responsable de la suppression des maladies fongiques dans les cultures (Mezzache, 2012).



**Figure 2:** Distribution des microorganismes dans le sol (Gobat *et al.*, 2003)

#### **I.1.4 Importance des bactéries dans le sol**

Les bactéries présentes dans le sol ont une action sur la formation et l'évolution du sol, elles sont participantes à la formation des microagrégats. Les bactéries sécrètent des composés organiques qu'on appelle humine bactérienne, constituant à part entière la matière organique humifiée (Gobat *et al.*, 2003). Les actinomycètes ont un rôle important dans le sol, grâce à leur capacité de dégrader des molécules complexes non biodégradable par les champignons ou les autres bactéries, telle que la chitine (Bedjadj, 2011) ainsi qu'à leur production de vitamines et d'antibiotiques (Dari, 2013).

#### **I.1.5 Facteurs de variation de l'activité des microorganismes du sol**

Les propriétés du sol, qualifiées d'écologiques et qui exercent une influence sur la microflore peuvent être divisées en deux catégories: les facteurs de régulation d'une part et les éléments nutritifs d'autre part. La matière organique du sol, l'humus, les résidus d'origine animale et végétale appartiennent à la seconde catégorie, tandis que la température du sol, l'humidité, le degré d'aération, la porosité, la structure sont surtout des facteurs de régulation des processus biochimiques. D'autres facteurs plus généraux qui interviennent dans l'évolution physico-chimique du sol participent également à l'écologie des microbes (Dari, 2013).

## I.2. Les enzymes

### I.2.1 Définition

Les enzymes sont les catalyseurs biologiques dont la structure est spécifiquement liée à leur fonction (Athel et al., 2005). Ce sont des macromolécules (10 à 100 kDa) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (Guendouz et Belibel, 2014). L'activité catalytique repose sur des interactions multiples avec d'autres molécules biologiques qui sont propres à chaque enzyme. Comparées aux catalyseurs chimiques, les enzymes sont capables d'amener plus rapidement une réaction à sa position d'équilibre (Sine, 2010).

### I.2.2 Origine des enzymes du sol

Les enzymes du sol proviennent en partie des plantes et des animaux, mais il est communément admis qu'elles sont en majorité d'origine microbienne. En effet, chez les microorganismes la digestion commence à l'extérieur de la cellule, sous l'action d'enzymes qui traversent les membranes et sont ainsi libérées dans le milieu extracellulaire. D'autres enzymes en général de poids moléculaire plus élevé, demeurent à l'intérieur des cellules, tout au moins tant qu'elles sont vivantes, ou liées à leurs extérieurs, une partie reste attachée aux fragments de membranes: après inclusion d'un échantillon de sol on peut, par des techniques d'histochimie, mettre en évidence des activités enzymatiques spécifiques dans ces fantômes de cellules. Les autres passent directement dans la phase aqueuse du sol (Davet, 1996).

### I.2.3 Classification

Selon la première recommandation en 1961 et la commission des enzymes de l'I.U.B. (*International Union of Biochemistry*), les enzymes sont réparties en six classes correspondant au type de catalyse et environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases. Le code de chaque classe débute par les caractères EC, suivi du chiffre de la classe attribuée (les différentes classes sont montrées dans le tableau III) (Sine, 2010).

#### I.2.3.1 Oxydoréductases

Cette classe comprend les enzymes catalysant des réactions d'oxydoréduction. Le nom conseillé est déshydrogénase, mais réductase peut aussi convenir. Oxydase est à utiliser seulement lorsque l'O<sub>2</sub> est l'accepteur pour la réaction. Le nom systématique est défini par

apport au donneur: accepteur oxydoréductase (Sine, 2010).

## I.2.3.2 Transférases

Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupe spécifique d'une molécule à une autre. Le nom systématique est défini par apport au donneur: accepteur groupe transférase (Sine, 2010).

## I.2.3.3 Hydrolase

Ces enzymes catalysent le clivage de divers liens comme C-O. Le nom systématique inclut le terme hydrolase (Sine, 2010).

## I.2.3.4 Lipases

Ces enzymes catalysent le clivage de divers liens comme C-C, par élimination. Les noms conseillés sont par exemple décarboxylase, aldolase, déshydratase. Le nom systématique est défini par apport au substrat groupe lyase (Sine, 2010).

## I.2.3.5 Isomérases

Les isomérases catalysent le réarrangement structural de la molécule. Les différents types d'isomérisation sont traduits par les noms des racémases, isomérases, tautomérases, mutases ou cycloisomérases (Sine, 2010).

## I.2.3.6 Ligase

Les ligases catalysent la liaison de deux molécules (X et Y) grâce au couplage d'une réaction d'hydrolyse du pyrophosphate, de l'ATP ou d'un autre nucléoside triphosphate. Le nom systématique est formé par rapport à X:Y ligase (Sine, 2010).

**Tableau III:** Classification des enzymes (Vincent et *al.*, 1996)

E.C (classes)	Classification	Type de réaction catalysée
E.C1	Oxydoréductases	Oxydoréduction
E.C2	Transférases	Transfère de groupement fonctionnel
E.C3	Hydrolases	Hydrolyse
E.C4	Lyases	Elimination de groupement et formation de doubles liaisons
E.C5	Isomérases	Isomérisation
E.C6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

EC: Enzyme Commission

## 1.2.4 Principales enzymes du sol

Les principales enzymes mises en évidence dans le sol sont les suivantes (**Davet, 1996**).

1. Oxydoréductases: déhydrogénases, glucose-oxydase, aldéhyde-oxydase, uricase, phénol-oxydases, ascorbate-oxydase, catalase, peroxydase, nitrate-réductase;
2. Transférases: dextrane-sucrase, lévane-sucrase, aminotransférase, rhodanèse;
3. Hydrolases: carboxylestérase, arylestérase, lipase, phosphatase, nucléase et nucléotidases, phytase, arylsulfatase, amylase, cellulase, laminarinase, inulase, xylanase, dextratase, protéinases et peptidases, asparaginase, glutaminase, uréase, pyrophosphatase;
4. Lyases: décarboxylases.

## 1.2.5 Les enzymes d'intérêt industriel

Avec l'essor de la biotechnologie, des procédés exploitant cette propriété microbienne ont été développés. Les microorganismes sont alors utilisés en divers industries pour des applications variées, les exemples d'utilisation industrielle des enzymes bactériennes sont multiples:

### 1.2.5.1 Les protéases

#### 1.2.5.1.1 Définition

Les protéases ou les protéinases font partie de la classe des hydrolases. En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique et sont produites extracellulairement comme intracellulairement (**Guendouz et Belibel, 2014**).

#### 1.2.5.1.2 Nomenclature

Il existe deux groupes de protéines regroupés se le terme protéase: les endoprotéases qui hydrolysent une liaison peptidique interne et les exoprotéases qui éliminent un ou deux acides aminés en N-terminal ou C-terminal de la protéine (**Mekdeour et Haraoui, 2017**).

- **Les endoprotéases (Guidera, 1997).**

1. Nom codifié des endoprotéases: Ec: 3.4.21-25
2. Nom systématique: (21) serine-protéinases, (24) metalloproteinases
3. Nom recommandé: Protéinases

- **Les exoprotéases (Guidera, 1997).**

1. Nom codifié des exoprotéases: Ec: 3.4.11-19.
2. Nom systématique:  $\alpha$ -aminoacylpeptide hydrolases, serine carboxypeptidases.
3. Nom recommandé: Peptidases

### **I.2.5.1.3 Mécanisme d'action des protéases**

- **Mécanisme réactionnel des peptidases à sérine (Sérylprotéases)**

Le polypeptide s'insère dans la protéase à sérine de telle manière que le groupement carbonyle soit proche de la sérine. Le groupement OH de la sérine attaque le groupement carbonyle et l'azote de l'histidine accepte le OH de la sérine, une association enzyme-substrat intermédiaire tétraédrique se forme. Puis, l'enzyme est acylée et le premier produit d'hydrolyse est libéré. Dans une réaction finale l'enzyme est déacylée et l'extrémité C-terminale est libérée (**Benchiheb, 2015**).

### **I.2.5.1.4 Origine des protéases**

Les protéases sont extraites aussi bien des plantes que des animaux ou des microorganismes comme les bactéries, les levures et les moisissures, mais les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles. Elles sont produites par une grande variété de bactéries dont, les actinomycètes, de moisissures et de levures (**Mekdeour et Haraoui, 2017**).

La subtilisine ou subtilase, une protéase produite par *Bacillus subtilis* et quelques genres apparentés (**Belmessikh, 2011**). Quelques exemples de microorganismes producteurs de protéases sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV: Microorganismes producteurs de protéase (Belmessikh, 2011).

Sources	Espèces
Levures	<i>Penicillium</i> sp.
	<i>Aspergillus terreus</i>
Moisissures	<i>Aureobasidium pullulans</i>
	<i>Candida lypolytica</i>
Bactéries	<i>Bacillus</i> sp.
	<i>Synergistes</i> sp.
Actinomycètes	<i>Streptomyces</i> sp.
	<i>Nocardiopsis alkaliphila</i> sp.

#### 1.2.5.1.5 Intérêts et utilisations industrielles des protéases

Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles et représentent 60% du total de la vente dans le monde entier (Guendouz et Belibel, 2014). La plupart des protéases commerciales, principalement neutres et alcalines sont produites par des organisations appartenant au genre *Bacillus* (Mekdeour et Haraoui, 2017).

Le grand succès des protéases microbiennes dans les systèmes biotechnologiques est attribué à la diversité biochimique très large, à la faisabilité de la culture de masse et la facilité des manipulations génétiques (Belmessikh, 2011). Elles sont généralement utilisées comme additives dans les détergents de blanchisserie, la transformation des produits alimentaires qui constituent aujourd'hui encore le principal domaine d'application des technologies enzymatiques et pharmaceutiques par un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Une élastotérase provenant de *B. subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes (Mekdeour et Haraoui, 2017) et dans les industries de tannage de cuir aussi bien que dans la gestion des déchets (Aissaoui, 2013).

#### 1.2.5.2 Les cellulases

##### 1.2.5.2.1 Définition

Les cellulases sont un groupe d'enzymes responsables de la dégradation de la cellulose dans la nature (Khelil, 2017). Elles sont principalement produites par les champignons, les bactéries et notamment les bactéries halophiles (Dari, 2013) mais aussi par des organismes

représentant le règne animal, y compris des insectes, des mollusques, des nématodes et des protozoaires (**Khelil, 2017**). Les cellulases se réfèrent à une classe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons 1,4  $\beta$ -D glycosidiques (**Dari, 2013**).

## 1.2.5.2.2 Les systèmes enzymatiques cellulolytiques

Le système enzymatique des cellulases comporte trois types importants d'enzymes. Elles incluent:

- L'endo-1,4- $\beta$ -glucanase qui attaque la cellulose en chaîne au hasard (**Belhadi et Meddour, 2012**) au niveau des régions amorphes, en créant de nouvelles extrémités non réductrices qui serviront de sites réactifs pour les cellobiohydrolases (**Benkerrou et Hamaili, 2012**).
- L'exo-1,4- $\beta$ -glucanase qui élimine le glucose ou cellobiose de l'extrémité non réductrice de la cellulose en chaînes (**Belhadi et Meddour, 2012**), il attaque les celluloses partiellement dégradées (**Benkerrou et Hamaili, 2012**).
- La  $\beta$ -D-glucosidase qui hydrolyse la cellobiose et d'autres cellodextrines hydrosolubles au glucose (**Belhadi et Meddour, 2012**).

## 1.2.5.2.3 Nomenclature

1. Nom codifié: Ec: 3.2.1.4
2. Nom systématique: 1,4 - (1,3; 1,4) - $\beta$ -D-Glucan 4-glucanohydrolase
3. Nom recommandé: Cellulase
4. Synonymes: Endoglucanase, Endo-1.4- $\beta$ -Glucanase, Cellulase carboxyméthylque,  $\beta$ -1.4-endoglucanhydrolase, Celludextrinase, Avicelase et d'autres (**Reffas, 2017**).

## 1.2.5.2.4 Mécanisme d'action de la cellulase

L'hydrolyse enzymatique des liaisons glycosidiques s'effectue par un mécanisme acide base, constitué d'un donneur de proton et d'une base nucléophile. Ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat. Généralement, l'hydrolyse des liaisons glycosidiques  $\beta$ (1-4) de la cellulose se fait avec rétention de la configuration du carbone anomérique (**Kermich, 2013**).

## I.2.5.2.5 Origine des cellulases

Les cellulases forment une classe d'enzyme largement répandues dans la nature, principalement produite par les champignons, les bactéries et les protozoaires. Cependant, d'autres cellulases sont produites par les plantes, les vers, les mollusques, les insectes, etc... **(Reffas, 2017)**. Parmi les bactéries cellulolytiques, certaines sont aérobies (*Sporocytophaga*, *Myxococcoides*, *Bacillus subtilis*, *Cellulomonas* et *Pseudomonas*, d'autres sont anaérobies strictes (*Clostridium thermocellum*, *Clostridium stercorarium*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefasciens* et *Bactéroides succinogenes*) **(Bensmira, 2006)**.

Actuellement, des cellulases halophiles dérivées de *Bacillus* sp. ont été caractérisées. Elles sont thermostables et également stables à l'alcalinité et à la salinité ce qui fait d'elles des candidates idéales pour différentes applications industrielles **(Aissaoui, 2013)**.

## I.2.5.2.6 Intérêts et utilisations industrielles des cellulases

L'intérêt que porte la biotechnologie à la cellulase s'explique par ces vastes applications. En effet, son utilisation permet potentiellement la production de glucose, élément de base, qui une fois fermenté permet d'accéder à d'autres substances clés à savoir alcools, acétones et acides organiques notamment des gras volatiles d'où l'importance **(Bensmira, 2006)**.

Certaines cellulases sont utilisées dans des formules médicamenteuses à vocation d'aide digestive **(Ouali et Tidjat, 2012)**. Aussi utilisées comme additifs dans l'alimentation animale, ajoutées aux aliments pour volailles ou porcins, améliorent leur digestibilité, dans la fabrication des pâtes à papier, dans l'industrie alimentaire, des textiles et des détergents **(Benkerrou et Hamaili, 2012)**.

## I.2.5.3 Les amylases

Les enzymes amylolytiques sont capables d'hydrolyser l'amidon (amylose et amylopectine) et ses produits de dégradation (dextrines, oligosaccharides) **(Kermiche, 2013)**.

- Alpha-Amylases ( $\alpha$ -amylases): Ce sont des enzymes dextrinisantes, scindent au hasard les liaisons  $\alpha$ -(1, 4) des chaînes d'amylose et d'amylopectine. Elles libèrent ainsi des dextrines qui serviront de nouveaux substrats pour la bêta-amylase **(Kermiche, 2013)**.

- Bêta-Amylase ( $\beta$ -amylase): La  $\beta$ -amylase ou enzyme saccharifiant spécifique des chaînes linéaires libère du maltose. Elle détache le maltose molécule par molécule en attaquant simultanément l'extrémité non réductrice de l'amylose et les ramifications non réductrices de l'amylopectine. Dans ce cas, l'action enzymatique de la bêta-amylase s'arrête aux branchements  $\alpha$ -(1, 6) et forme ainsi des dextrines (**Kermiche, 2013**).

### I.2.5.3.1 L'alpha amylase

#### I.2.5.3.1.1 Définition

L' $\alpha$ -amylase est une enzyme ubiquitaire, synthétisée dans tous les genres de la vie. Elle appartient à la famille des glycosides hydrolases (**Dakhmouch, 2016**), Elle hydrolyse, les liaisons osidiques de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides contenant plus de trois liaisons  $\alpha$  (1,4) D-Glucose (**Kolli et Zatout, 2015**). Le substrat classique de l' $\alpha$ -amylase est l'amidon, constitué de l'amylose et l'amylopectine (**Dakhmouch, 2016**).

#### I.2.5.3.1.2 Nomenclature de l' $\alpha$ -amylase

1. Nom codifié: E.C: 3.2.1.1
2. Nom systématique: 1,4- $\alpha$  -D-glucane-4-glucano hydrolase.
3. Nom commun:  $\alpha$ -amylase.
4. Synonymes: glycogénase, endoamylase, taka-amylase, maxilase. (**Ferhat et Laklouka, 2015**).

#### I.2.5.3.1.3 Mécanisme d'action de $\alpha$ amylase

L'activité catalytique de l'enzyme impliquée la participation des trois acides aminés du site actif: Asp 231 (nucléophile catalytique), Glu 261(donneur catalytique de l'hydrogène) et Asp 328 (l'aide de catalyse). En effet, la réaction catalytique est réalisée en trois étapes: (**Dakhmouch, 2016**).

1. Protonation de l'oxygène glucosidique par le donneur de proton Glu 261 suivi d'une attaque nucléophile sur C1 du résidu du sucre en position 1 par Asp 231 et le départ de l'extrémité réductrice du substrat.
2. Activation d'une molécule d'eau, vrai semblablement par le maintien du Glu 261

déprotoné.

5. Régénération de l'état initial et libération de l'autre fragment du substrat, par hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucléophile de l'Asp 231 et le C1 de résidu du sucre en position1 (**Ferhat et Laklouka, 2015**).

#### I.2.5.3.1.4 Origine des $\alpha$ amylases

Les  $\alpha$ -amylases sont abondantes dans tous les règnes (**Dakhmouch, 2016**), elles ont été isolées par extraction à partir des tissus végétaux et animaux ou par fermentation par des cellules microbiennes (**Ferhat et Laklouka, 2015**). Ce type d'enzyme est obtenu principalement par fermentation de *Bacillacées*, historiquement la première enzyme a été produite à partir de souches de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* ou *B. subtilis*. Cependant d'autres espèces, produisant également cette enzyme telle que *Thermobifida fusca*, *Streptomyces* sp.

De nombreuses amylases aux propriétés industrielles ont été découvertes chez des bactéries acidophiles, alcalinophiles et thermophiles. Par ailleurs, les levures participent également à la production de l' $\alpha$ -amylase (**Kolli et Zatout, 2015**), certaines levures produisent industriellement de l' $\alpha$ -amylase: *Candida*, *Filobasidium capsuligenum* (**Dakhmouch, 2016**).

#### I.2.5.3.1.5 Intérêts et utilisations industrielles des $\alpha$ -amylases

Les  $\alpha$ -amylases sont parmi les hydrolases les plus importantes pour toutes les industries à base d'amidon et leur commercialisation est la plus ancienne. Actuellement la production de l' $\alpha$ -amylase met en jeu des procédés biotechnologiques à moindre coût (**Dakhmouch, 2016**), les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes, constituant une classe d'enzymes industrielles ayant environ 25% du marché mondial des enzymes (**Ouaglal et Yous, 2017**).

Dans le domaine pharmaceutique, les  $\alpha$ -amylases sont utilisées comme agent anti-inflammatoire et dans le domaine médical, le taux de l' $\alpha$ -amylase dans les liquides biologiques peut être utilisé pour détecter certaines maladies: insuffisance cardiaque, oreillons, cancer du pancréas (**Ferhat et Laklouka, 2015**).

Les  $\alpha$ -amylases sont aussi utilisées dans l'industrie textile pour le désencollage des tissus ainsi que dans les domaines de la tannerie, de la papeterie et des détergents pour les

lessives où elles facilitent la disparition des tâches en dégradant les souillures, permettant ainsi l'augmentation du pouvoir blanchissant. Elles sont utilisées aussi dans le traitement des eaux résiduaires pour l'élimination de l'amidon (Ferhat et Laklouka, 2015).

## I.2.5.4 Les lipolytiques

Dans la vaste classe des enzymes catalysant l'hydrolyse de divers esters, nous distinguons les lipases et les estérases en fonction de leur spécificité relative préférentielle. Les substrats naturels des lipases sont les huiles et les graisses, c'est-à-dire les triglycérides des acides gras à longue chaîne, alors que les estérases agissent sur des esters simples d'acides de faible poids moléculaire (Bier, 1955), les estérases suivent la cinétique de Michaelis-Menten, alors que les lipases nécessitent une concentration minimale en substrat pour montrer des niveaux d'activité élevés (Goldberg et Mateles, 2011).

### I.2.5.4.1 Classification

La classification des enzymes lipolytiques peut être effectuée soit en fonction de leur substrat, soit par alignement de séquences. Le premier exige que toutes les enzymes devant être comparées aient été testées avec le même substrat ou du moins des substrats apparentés, de préférence dans des conditions de réaction similaires. En raison de la disponibilité croissante d'informations sur les séquences dans les bases de données publiques, la comparaison des séquences d'acides aminés peut fournir une image plus claire de la relation évolutive entre les enzymes d'origine différente. D'autre part, il s'avère souvent qu'une homologie de séquence élevée ne peut pas être liée aux propriétés des enzymes (Bornscheuer, 2002).

### I.2.5.4.2 Les estérases

#### I.2.5.4.2.1 Définition

Les estérases sont les enzymes de la classe des hydrolases impliquées dans la catalyse du clivage et la formation de liaisons ester (Kulkarni et al., 2013), il sont impliquées dans les réactions d'interestérisation, d'intestérisation et de transestérisation (Kohli et Gupta, 2016). Les estérases diffèrent des lipases principalement sur la base de la spécificité du substrat et de l'activation interfaciale, l'estérase hydrolyse les acides carboxyliques à chaîne courte (moins que C-12) tandis que la lipase hydrolyse les triglycérides insolubles à chaîne longue (supérieure à C-12) (Hupe, 2008).

## I.2.5.4.2.2 Nomenclature d'estérase

1. Nom codifié de l'estérase: Ec: 3.1.1.3 (**Bornscheuer, 2002**).
2. Nom systématique: Ester Carboxylique Hydrolase
3. Nom recommandé: Estérase
4. Synonymes:  $\alpha$ -carboxylestérase,  $\beta$ -estérase, Estérase A, Estérase B, Estérase D, Ester carboxylique hydrolase, Carboxylate estérase (**Kulkarni et al., 2013**).

## I.2.5.4.2.3 Mécanisme d'action des estérases

Il a été possible de suggérer un mécanisme d'action pour ces enzymes, la liaison entre le substrat estérifié et l'enzyme estérase s'effectue de telle sorte que le lien ester du substrat se retrouve à proximité du groupement hydroxyle de la sérine. À ce stade, la sérine perd son proton qui est fortement attiré par un lien hydrogène à un atome d'azote qui faisant partie du groupement imidazole de l'histidine. Par la suite, il y a une réaction de transestérification. Ainsi, l'oxygène de la sérine de l'estérase forme un lien ester avec le groupement acyle du carbone du substrat, ce qui cause en même temps un clivage du lien ester original du substrat. Le premier produit formé quitte le site actif de l'enzyme avec le proton de l'histidine (formation d'un alcool) (**Gariepy, 2000**).

L'intermédiaire nouvellement formé est très instable, ce qui favorise l'hydrolyse avec une molécule d'eau. La réaction génère un second produit soit, la portion carboxylique du substrat. Cette hydrolyse permet également la restauration du proton sur le groupement hydroxyle de la sérine. Ainsi, au cours du mécanisme d'action la sérine qui est un acide aminé nucléophile, joue un rôle de stabilisation du substrat en formant un lien ester avec ce dernier. Le groupement imidazole de l'histidine et le groupement carboxylique de l'acide aspartique participent pour leur part, aux mouvements d'association de proton (**Gariepy, 2000**).

## I.2.5.4.2.4 Origine des estérases

Des estérases ont été isolées chez des plantes, des animaux et des microorganismes (**Kulkarni et al., 2013**), mais les sources microbiennes sont considérées comme importantes source d'estérase (**Kohli et Gupta, 2016**) car leur coût de croissance et d'entretien est moins élevé et elles sont faciles à manipuler. Toutes les classes de microorganismes tels que les bactéries, les champignons, les actinomycètes produisent des estérases de manière constitutive ou inductible (**Kulkarni et al., 2013**).

Les estérases d'origine extrémophile en particulier sont les plus biocatalyseurs et les plus robustes, car ils peuvent fonctionner dans des conditions difficiles. L'estérase intracellulaire thermostable de *Bacillus* sp. et estérase induite par tributyrine chez *Lactobacillus casei* diffèrent des enzymes produit par *Aspergillus* sp. ou *Sporotrichum* sp. (Benmammam et al., 2016).

#### I.2.5.4.2.5 Intérêts et utilisations industrielles des estérases

Les estérases jouent un rôle majeur dans la dégradation des matériaux naturels et des polluants industriels, à savoir les déchets de céréales, les plastiques et autres produits chimiques toxiques, utiles dans la synthèse de composés optiquement purs, parfums et antioxydants (Benmammam et al., 2016). elles peuvent également être utilisées dans des réactions où la chimio ou la régiosélectivité présente un intérêt. L'exemple le plus frappant est l'utilisation de carboxyle estérases dans la libération d'acide férulique à partir de polysaccharides de la paroi cellulaire de plantes (Bornscheuer, 2002).

Les estérases sont utilisées du diagnostic au traitement du cancer, des maladies de neurodégénérescence ainsi que d'autres maladies chroniques telles que l'angioedème héréditaire et l'hypercholestérolémie (Kohli et Gupta, 2016).

#### I.2.5.4.3 les lipases

##### I.2.5.4.3.1 Définition

Ce sont des enzymes qui hydrolysent des longues chaînes de triglycérides avec la formation des diglycérides, des monoglycérides, des glycérols et des acides gras libres. La réaction est réversible et les lipases catalysent la formation des lipides (Kermiche, 2013). Les lipases constituent une classe particulière d'estérases capables d'hydrolyser des esters carboxyliques agrégés en phase aqueuse. La réaction de catalyse nécessite une molécule d'eau et se déroule à l'interface eau / substrat insoluble (Fichers et al., 2008).

##### I.2.5.4.3.2 Nomenclature de lipase

1. Nom codifié de lipase: Ec: 3.1.1.1 (Bornscheuer, 2002).
2. Nom systématique: Triacylglycerol hydrolases (Bornscheuer, 2002).
3. Nom recommandé: Lipase

### I.2.5.4.3.3 Mécanisme d'action des lipases

La réaction commence par une attaque nucléophile du carbone provenant de la liaison ester du substrat susceptible par un groupe hydroxyle dans le résidu sérine du site actif, formant un complexe acyl-enzyme et libérant de l'alcool de le lipide. Plus tard, le complexe acyl-enzyme est hydrolysé, libérant la lipase régénérée (**Goldberg et Mateles, 2011**).

En outre, des caractéristiques telles que la stabilité en présence de solvants organiques, l'absence de cofacteurs pour leur l'action et une énantiosélectivité élevée, rendent les lipases en un groupe d'enzymes ayant l'un des principaux intérêts technologiques (**Sharma et Varma, 2001**).

### I.2.5.4.3.4 Origine des lipases

Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses. On les retrouve aussi bien dans le règne végétal, chez les invertébrés et les vertébrés mais également chez de nombreux microorganismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires. Elles ont été mises en évidence, dès 1901 (**Fichers et al., 2008**) telles que les lipases, produites par les genres *Serratia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Fusarium* et *Alternaria*.

Pour l'instant de nombreuses études ont permis de révéler plusieurs activités lipolytiques dans le monde des halophiles. Les souches ont été identifiées comme membres des genres apparentés au genre *Bacillus* et qui sont *Oceanobacillus*, *Thalassobacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus* et *Gracilibacillus*. Ces microorganismes produisent des lipases actives en présence de fortes concentrations salines (**Aissaoui, 2013**).

### I.2.5.4.3.5 Intérêts et utilisations industrielles des lipases

Les lipases sont dotées d'une spécificité de substrat supérieure à celle de toute autre enzyme connue, ils forment un groupe d'enzymes important d'un point de vue biotechnologique et elles trouvent leurs applications dans l'industrie alimentaire, les industries pharmaceutiques, l'industrie agro-alimentaire (industrie laitière) (**Hupe, 2008**), de cosmétiques, de cuir, de parfumerie, de produits de diagnostic médical et d'autres matériaux synthétiques organiques ainsi que l'industrie des détergents et même dans la production du biodiesel (**Benmammar et al., 2016**).

### I.3 Le genre *Pseudomonas*

Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant le milieu avec des commensaux représentés principalement par les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve partout, particulièrement dans les systèmes racinaires des plantes. Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique (**Mazaache, 2012**).

#### I.3.1 Caractéristiques du genre *Pseudomonas*

Ce sont des bactéries ubiquistes particulièrement abondantes dans les sols, la rhizosphère, la phyllosphère, les tissus végétaux et animaux en décomposition (**Morgaint, 2015**), les eaux et souvent pathogènes des animaux et des végétaux (**Rabhi, 2011**).

Ce sont des bacilles à Gram négatif, droits et fins, aux extrémités arrondies, d'une taille moyenne de 0,5 à 1,0  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 1,5 à 5,0  $\mu\text{m}$  (ou plus) de longueur, mobile grâce à une ciliature polaire (1 à 3 flagelles) (**Akacem, 2012**) qui peut être isolé, en paires ou en chaînes. Sur gélose nutritive, les colonies sont rondes, blanches et lisses (**Morgaint, 2015**).

De plus, elles sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques, se cultivant sur des milieux usuels non enrichis, utilisent de nombreux substrats hydrocarbonés pour leur nutrition carbonée et leur énergie. Ayant un type respiratoire aérobie strict (**Akacem, 2012**).

#### I.3.2 Caractéristiques métaboliques du genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* est caractérisé par un métabolisme oxydatif et non fermentatif, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons et même quelques souches utilisent la dénitrification, elles sont aussi catalase positive, non photosynthétiques, mésophile chimio-organotrophes organotrophes puisqu'elles peuvent croître dans un milieu minéral ne contenant qu'une seule source de carbone (**Akacem, 2012**). Toutefois, certaines sont chimio-organotrophes facultatives et peuvent utiliser l'hydrogène comme source d'énergie et n'ont pas besoin de facteurs de croissance pour se multiplier. Elles peuvent utiliser des sources de carbones variable et certaines ont la capacité de croître même dans l'eau (**Mazaache, 2012**).

Les températures cardinales aux quelles les espèces se multiplient varient de 4 à 42°C, cette dernière est caractéristique de l'espèce *P. aeruginosa*, alors que la température optimale pour la croissance des espèces saprophytes est située entre 28°C et 30°C. Toutes les espèces de ce genre ne peuvent croître à pH inférieur à 4.5 (**Mazaache, 2012**).

### I.3.3 Classification du genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important découvert en 1894 par Migula (**Rabhi, 2011**), il appartient au phylum des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria* à la sous-classe  $\gamma$  des *protéobactéries* (**Mazaache, 2012**), famille des *Pseudomonaceae*, ordre des *Pseudomonales* (**Akacem, 2012**) comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (**Mazaache, 2012**). Le genre *Pseudomonas* on dénombre à ce jour 350 espèces, sous-espèces ou pathovars de bactéries phytopathogènes (**Mazaache, 2012**).

Le sous-groupe des *Pseudomonas fluorescents*, appartenant au premier groupe génomique, est certainement le plus étudié. Les espèces appartiennent à ce groupe sont: *Pseudomonas aeruginosa*, espèce pathogène pour l'homme, *P. syringae*, espèce phytopathogènes et *P. fluorescens*, *P. putida*, et *P. chlororaphis* rassemblent des espèces saprophytes (**Rabhi, 2011**).

### I.3.4 L'importance du genre *Pseudomonas*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* occupent la plupart des environnements naturels. Elles présentent un fort potentiel d'adaptation physiologique et génétique. D'un point de vue écologique, les *Pseudomonas* regroupent des espèces bénéfiques pour l'environnement et des espèces pathogènes (**Akacem, 2012**).

Les *Pseudomonas* spp. sont capables de dégrader de nombreux composés organiques, tels des composés halogénés, des hydrocarbures aromatiques et des herbicides (**Akacem, 2012**), les protéines et les polysaccharides complexes comme l'amidon, la cellulose (**Mazaache, 2012**). les *Pseudomonas* spp. aussi utilisées dans les processus de décontamination des sols (bioremédiation), elle possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique (**Rabhi, 2011**).

*P. fluorescens* produit également certaines enzymes stables à la chaleur (lipases et

protéases) qui sont impliquées dans l'altération du lait; mais aussi certains antibiotiques qui contribuent à la protection contre les pathogènes (**Goldberg; Mateles, 1975**).

Différentes espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été rapportés à la fois comme PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) et comme souches de biocontrôle des champignons phytopathogènes *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis* et *P. cepacia*. Toutefois, les *Pseudomonas* spp. fluorescents ne sont pas tous des antagonistes (**Mazaache, 2012**).

## **Partie II**

### **Matériel et Méthodes**

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de zoologie de l'université Mohamed El Bachir EL Ibrahimi de bordj Bou Arreridj - Algérie, durant la période allant du 04 mai 2019 au 15 juin 2019.

### II.1 Matériel

#### II.1.1 Matériel analytique

Le matériel utilisé dans cette étude est résumé dans annexe 01.

#### II.1.2 Matériel biologique

##### II.1.2.1 Le sol:

Dans cette étude nous avons utilisé deux échantillons du sol (échantillon 1, échantillon 2) qui ont été prélevés respectivement du Goléa, Ghailasa dans la wilaya de bordj Bou Arreridj.

##### II.1.2.2 Milieux de culture

- Les milieux utilisés au cours de ce travail (Gélose Nutritive (GN) , Plate Count Agar (PCA), Bouillon Nutritif (BN), King A, King B, La gélose de Gause, la gélose à la carboxyméthylcellulose (CMC), le milieu de Sierra additionné de tween 80, le milieu de Sierra additionné de tween 20, la gélosé au lait écrémé), étaient soit des milieux liquides (1% agar v/v), soit des milieux solides (1% agar m/v). La stérilisation des milieux est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20 min à l'exception de Tween 20 et Tween 80 qui sont stérilisée séparément pendant 10 min à 110°C avec 0.5 bar. La composition des milieux qui ont servi à notre étude sont rapportés en détail dans l'annexe 02.
- La solution du lait qui est déjà stérile (Candia a 0% matière grasse liquide).
- Une solution de Lugol (annexe 02) utilise comme réactif pour la révélation de l'activité amylolytique et carboxyméthylcellulase (CMCase).
- L'eau physiologie (annexe 02).

##### II.1.2.3 Localisation des sites de prélèvement

Dans le but de rechercher des bactéries productrices d'enzymes d'intérêt, deux prélèvements du sol est effectué pendant le mois d'Avril 2019. Les échantillons de sol sont

collectés stérilement de deux régions différentes:

1. **Région 1:** Il s'agit d'un terrain qui a une superficie de 899 m<sup>2</sup> avec des oliviers, situé à l'endroit appelé Tigert dans le village du Goléa-Tasamert à Bordj Zemmoura au nord de la wilaya de Bordj Bou Arreridj (Figure 03).
2. **Région 2:** Il s'agit d'une forêt de pins, situé dans la région de Ghailasa de Bordj El Ghadir se situe au sud de la wilaya de Bordj Bou Arreridj (Figure 04).





**Figure 03:** Site de collecte de l'échantillon du sol 1 dans la région de Goléa.



**Figure 04:** Site de collecte de l'échantillon du sol 2 dans la région de Ghailasa.

**Tableau V:** Origine des échantillons du sol et leurs aspects.

Echantillon	Origine	Type de sol	Aspect
Sol 1	Goléa	Forestière, riche en oliviers	
Sol 2	Ghailasa	Forestière, riche en pins	

## II.2 Méthodes

### II.2.1 Prélèvement des échantillons

Deux échantillons de sol sont collectés dans deux sites de la wilaya de Bordj Bou Arreridj (Goléa, Ghailasa). Les deux échantillons ont été prélevés à l'aide d'une grande spatule stérile comme suit: les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés, 50 à 100 grammes de terre de la couche sous-jacente (5 à 20 cm de profondeur) sont introduits dans un sachet en plastique stérile, ils sont mis dans une glacière (4°C) et sont directement transportés au laboratoire en vue de leurs analyses (**Merabti, 2006**). Les étapes de prélèvement sont mentionnées dans la figure 05 (annexe 03).

### II.2.2 Isolement et purification des souches bactériennes

#### II.2.2.1 Préparation de la solution mère

A partir de chaque échantillon de sol destiné à l'analyse, 1g de sol est pesé puis introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. Le tube est ensuite agité énergiquement pendant 2 minutes. Le contenu représente la solution mère (**Harouna et Alkama, 2014**).

#### II.2.2.2 Préparation des dilutions

Les dilutions ont été préparées en mélangeant un volume de 1ml de la suspension mère de chaque échantillon du sol avec 9 ml d'eau physiologie. à l'aide d'une micropipette pour obtenir la dilution  $10^{-1}$ . 1 ml de cette dilution est mélangé à 9 ml d'eau physiologique stérile, correspond à la dilution  $10^{-2}$ , en répétant cette opération avec chaque dilution jusqu'à l'obtention d'une série de dilution décimale (de  $10^{-1}$  à  $10^{-8}$ ) (**Harouna et Alkama, 2014**).

#### II.2.2.3 Isolement

Cette étape permet de mettre en évidence la flore microbienne existante dans les deux échantillons de sol. Les bactéries sont isolées partir des dilutions décimales ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$ ) par l'ensemencement de 100 µl de chacune de ces dilutions en surface sur les quatre milieux d'isolements; (PCA, GN) pour l'isolement de la flore totale et le (king A, king B) pour l'isolement des *Pseudomonas*, avec 03 répétitions pour chaque dilution, les boîtes ont été ensuite incubées à 29°C pendant 24 à 72h (**Belhadi et Ait Meddour, 2013**).

### II.2.2.4 La purification

Après 24h d'incubation, différentes colonies sont obtenues. Chaque colonie d'aspect macroscopique différent (diamètre, couleur, forme, opacité) est ensemencée dans un milieu solide (PCA, GN, king A et king B) par la technique de stries serrées. Les boîtes sont incubées 18 à 24h à 29°C (**Harouna et Alkama, 2014**).

### II.2.2.5 Conservation

Une fois purifié, chaque isolat est désigné par un numéro de code précédé par la lettre (E1 pour le premier échantillon, E2 pour le deuxième échantillon, P1 pour les *Pseudomonas* du premier échantillon et P2 pour les *Pseudomonas* du deuxième échantillon). La conservation des isolats a ensuite été réalisée dans des tubes à essais contenant du BN, où après incubation des tubes à 29°C pendant 24 h et l'apparition d'un trouble, ils ont été conservés au réfrigérateur à 4°C (**Suzuki et al., 1999**).

## II.2.3 La mise en évidence des activités enzymatiques

### II.2.3.1 Dépistage de l'activité protéolytique

L'hydrolyse de la caséine a été étudiée sur un milieu de base supplémenté par 10% (v/v) de lait écrémé selon la méthode de Smibert et Krieg (**Mezaache, 2012**), par la mise en culture des isolats pendant 24h à 72h à 29°C.

La présence de cette activité est mise en évidence par apparition d'un halo clair autour des colonies indiquant une hydrolyse des protéines du lait, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (**Raval et al., 2012**).

### II.2.3.2 Dépistage de l'activité de la carboxyméthylcellulase (CMCase)

Cette activité a été testée sur milieu de Carder; une gélose additionnée de la CMC. Le milieu est coulé sur boîtes de Pétri, ces dernières sont ensemencé puis incubé à 29°C pendant 5 à 8 jours (**Carrim et al., 2006**).

L'ajout de Lugol pendant 15 min permet de mettre en évidence la dégradation de la cellulose (**Bouzigha et Bouchiba, 2017**). Le développement d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive (**Verma et al., 2007**).

### II.2.3.3 Dépistage de l'activité amylolytique

La présence de l'activité amylolytiques est déterminée qualitativement selon la méthode de Williams et Cross (**Harouna et Alkama, 2014**). L'activité à été testée sur la gélose de Gause; milieu de base additionné de 1% (m/v) d'amidon soluble. Le milieu est coulé sur boîtes de Pétri, ensemencé puis incubé à 29°C. Après sept jours, la gélose est recouverte d'une solution de Lugol. Après quelques minutes du contact, l'excès éliminé et les boîtes sont lavés à l'eau distillée.

La présence de l'amidon dans le milieu donnera une couleur bleue noire, ceci implique une absence d'activité amylasique. En revanche, si l'amidon est hydrolysé, une zone claire apparaîtrait autour des colonies, ce qui traduit une présence d'activité amylasique chez les isolats. Le diamètre des zones de lyse, est pris en considération pour la sélection des isolats les plus performants (**Harouna et Alkama, 2014**).

### II.2.3.4 Dépistage de l'activité estérasique

L'activité estérasique est testée sur le milieu de culture utilisé par Sierra (1957) contenant le Tween 80 (1%, v/v), après ensemencement du milieu, les boîtes sont incubées à 29°C pendant 7 jours (**Carrim et al., 2006**).

La présence d'une activité estérasique est traduite par l'apparition d'un halo clair autour des colonies sans l'ajout d'aucun réactif (**Bouzigha et Bouchiba, 2017**).

### II.2.3.5 Dépistage de l'activité lipolytique

La recherche de l'activité lipolytique est réalisée de la même manière que l'activité estérasique. Toutefois, le tween 80 est remplacé par le tween 20. Après ensemencement et incubation à 29°C pendant 7 jours, la présence d'enzyme lipolytique se distingue par la formation d'un halo clair autour des colonies en raison de la dégradation du sel de l'acide gras qui constitue le Tween 20 (**Kermiche et al., 2013; Carrim et al., 2006**).

## II.2.4 Analyse statistique

L'indice enzymatique a été calculé selon la formule suivante:

Indice enzymatique = Diamètre du halo/ Diamètre de la colonie (**Carrim et al., 2006**).

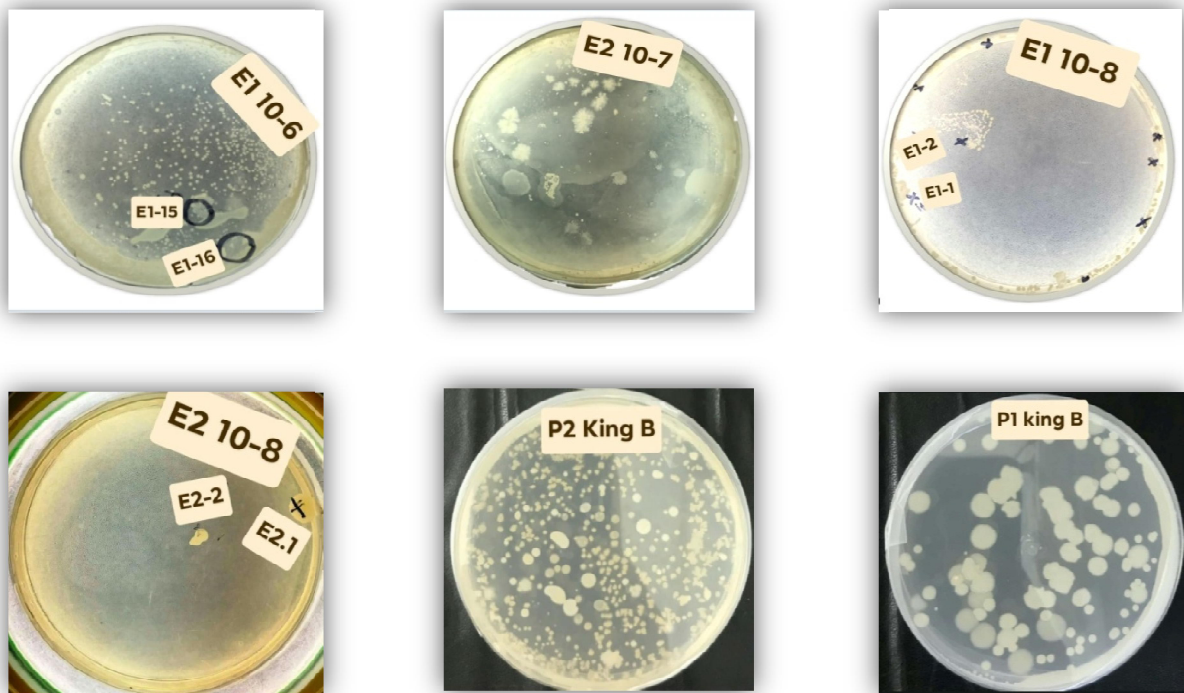
## **Partie III**

# **Résultats et Discussion**

### III.1 Résultats

#### III.1.1 Isolement et purification des souches bactériennes

Après l'ensemencement sur les différents milieux gélosés (PCA, GN, King A et King B), les colonies des bactéries du sol sont apparues au bout de deux à trois jours d'incubation à 29°C (figure 06 et 07). Ceci signifie que la croissance des souches est rapide.



**Figure 06:** Quelques aspects des colonies obtenues sur PCA, GN, king A et king B à partir du sol.

#### III.1.2 Dénombrement (concentration des cellules bactériennes)

Le dénombrement de cette flore n'a pu être réalisé qu'à partir de la dilution décimale  $10^{-6}$ ; car dans les dilutions décimales ( $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ ) de chaque échantillon, les colonies observées sont très denses et indénombrables. Le calcul de l'UFC (unité formant colonie) par gramme d'échantillon est réalisé à partir de la dilution décimale  $10^{-6}$ .

On a pu compter (250, 240, 200), (240, 100, 80), (120, 100, 50) colonies visibles respectivement sur les boîtes des dilutions  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$  pour la flore totale et (280, 250, 45, 35), (150, 130, 122, 120) colonies visibles respectivement sur les boîtes des dilutions  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$  pour les *Pseudomonas* spp., on peut donc calculer la concentration des cellules

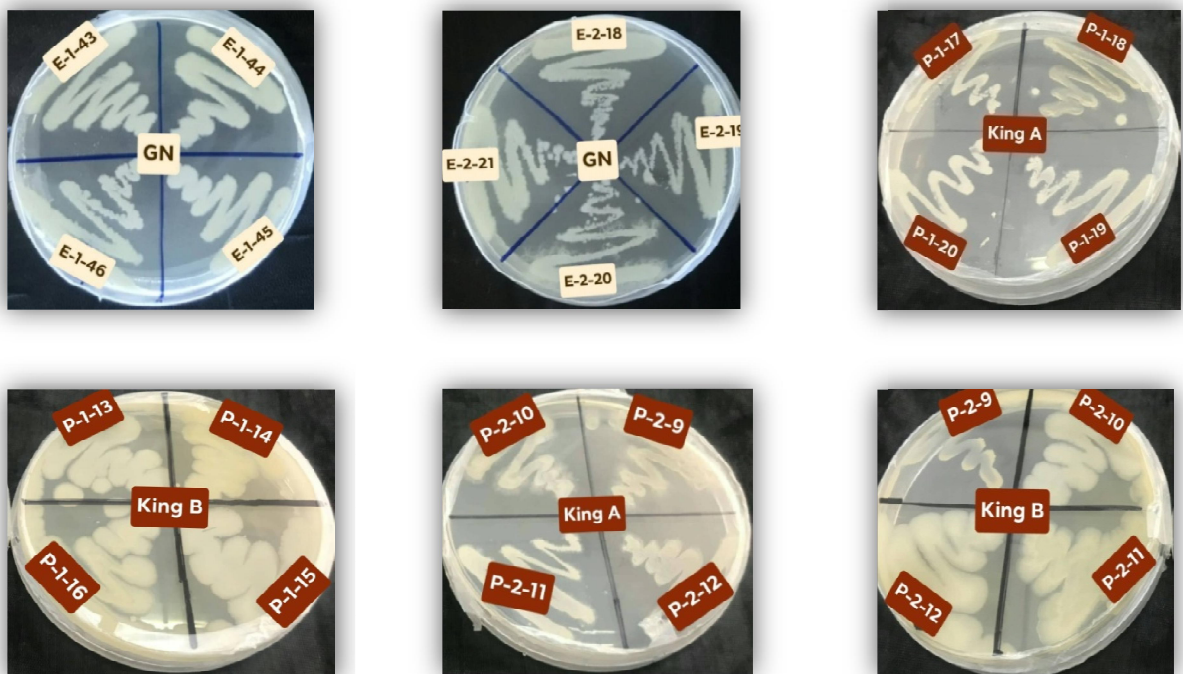
bactériennes dans la suspension du sol des deux échantillon (E1 et E2), les résultats sont illustrés dans le tableau VI.

**Tableau VI:** Dénombrement de la flore tellurique en UFC/g dans les échantillons du sol.

	Sol du Goléa (E1)	Sol du Ghailasa (E2)
PCA, GN	12.5 .10 <sup>9</sup>	16.65 .10 <sup>9</sup>
King A	62.25 .10 <sup>8</sup>	21.5 .10 <sup>9</sup>
King B	62.75 .10 <sup>9</sup>	77.5 .10 <sup>8</sup>

E1: échantillon 1, E2: échantillon 2, GN: gélose nutritive, PCA: Plate Count Agar

En se basant sur l'aspect des isolats sur milieu solide, 110 colonies différentes sont isolées (46 isolats de la flore totale et 20 isolats des *Pseudomonas* spp. à partir du sol (E1) et 24 isolats de la flore totale et 20 isolats des *Pseudomonas* spp à partir du sol (E2). Ces colonies représentent une grande diversité de taille, de forme, de couleur et de surface (figure 07). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'échantillon de sol (E1) est relativement plus riche en matière organique que l'échantillon de sol (E2) (Lee et Hwang, 2002).



**Figure 07:** Photographies représentant le résultat de purification de certains isolats sur GN, king A et king B.

### III.1.3 Conservation

Suite à l'apparition d'un trouble après l'incubation des tubes à 29°C pendant 24h, les isolats ont été conservés dans des tubes à essais contenant du bouillon nutritif dans le réfrigérateur à 4°C (figure 08).



**Figure 08:** Conservation des isolats obtenus à partir du sol en milieu liquide (bouillon nutritif).

Les bactéries isolées du nombre de 110 sont désignés comme suit:

66 isolats du Sol 1 (E1)

- 46 isolats bactériens nommés de E-1-1 jusqu'a E-1-46.
- 20 isolats *Pseudomonas* spp. nommés de P-1-1 jusqu'a P-1-20.

44 isolats du Sol 2 (E2)

- 24 isolats bactériens nommés de E-2-1 1 jusqu'a E-2-24.
- 20 isolats *Pseudomonas* spp. nommés de P-2-1 jusqu'a P-2-20.

### III.1.4 La mise en évidence des activités enzymatique

Les activités protéolytiques, cellulosesques, amylolytiques, estérasiques et lipolytiques ont été mises en évidence en utilisant respectivement les milieux: gélose additionnés du lait écrème, CMC, d'amidon, du Tween 20 et Tween 80.

Tous les isolats étudiés sauf les isolats (**E-1-23, P-1-9, E-2-2, P-2-17, P-2-18, P-2-19 et P-2-20**) étaient productrices d'enzymes hydrolytiques, avec une dominance de l'activité

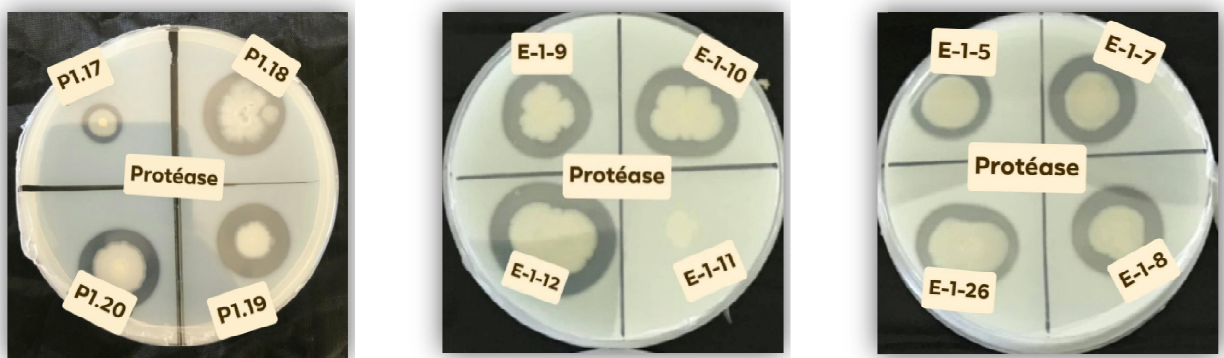
protéolytique, cellulosique et estérasique respectivement et une trop faible activité amylasique et lipolytique.

### III.1.4.1 La mise en évidence des activités enzymatiques des isolats du sol de Goléa

#### III.2.3.1 Dégradation de la caséine

La recherche de cette activité chez les isolats nous a permis de détecter 52 isolats à partir du sol (E1), les isolats sont (E-1-1, E-1-2, E-1-3, E-1-5, E-1-6, E-1-7, E-1-8, E-1-9, E-1-10, E-1-12, E-1-13, E-1-14, E-1-15, E-1-16, E-1-17, E-1-18, E-1-19, E-1-20, E-1-21, E-1-22, E-1-24, E-1-26, E-1-27, E-1-28, E-1-30, E-1-31, E-1-32, E-1-33, E-1-36, E-1-37, E-1-38, E-1-39, E-1-44, E-1-45, E-1-46, P-1-1, P-1-2, P-1-3, P-1-4, P-1-5, P-1-8, P-1-10, P-1-11, P-1-12, P-1-13, P-1-14, P-1-15, P-1-16, P-1-17, P-1-18, P-1-19 et P-1-20).

La mise en évidence de l'activité caséinolytique chez les isolats se fait par l'apparition de zones claires autour des colonies bactériennes sans l'ajout d'aucun réactif après 24h d'incubation, cela est dû à la dégradation des protéines du milieu. Elles sont donc productrices d'enzymes (protéases) dégradant les protéines du lait écrémé (figure 09).

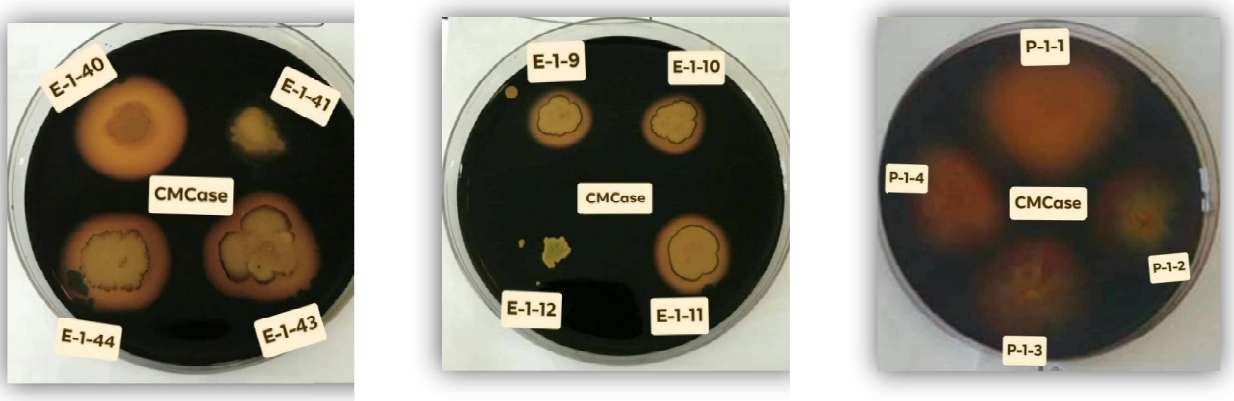


**Figure 09:** Photographies représentant le résultat positif et négatif de l'activité caséinolytique de certains isolats du sol de Goléa.

#### III.1.4.1.2 Dégradation de la carboxyméthylcellulose

Parmi les 66 d'isolats, les isolats (E-1-5, E-1-6, E-1-7, E-1-8, E-1-9, E-1-10, E-1-11, E-1-13, E-1-14, E-1-15, E-1-17, E-1-18, E-1-19, E-1-20, E-1-22, E-1-24, E-1-25, E-1-26, E-1-27, E-1-28, E-1-29, E-1-30, E-1-31, E-1-32, E-1-33, E-1-34, E-1-35, E-1-37, E-1-38, E-1-41, E-1-42, E-1-43, E-1-44, E-1-45, E-1-46 et P-1-1, P-1-2, P-1-3, P-1-4, P-1-10, P-1-11, P-1-13, P-1-14, P-1-15, P-1-16) ont monté des zones d'hydrolyse de CMC après traitement avec

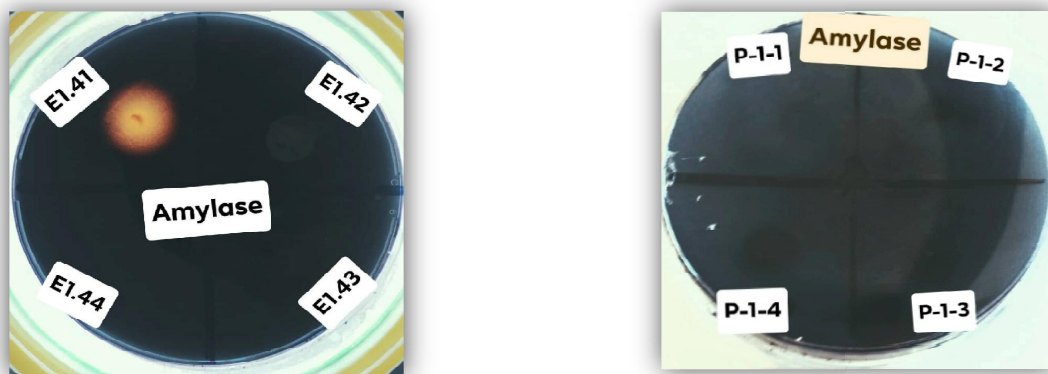
le Lugol, où les colonies apparaissent entourées d'un halo jaune orangé avec différents diamètres selon les isolats (Figure 10).



**Figure 10:** Photographies représentant le résultat positif et négatif de l'activité carboxyméthylcellulosique de certains isolats du sol de Goléa.

#### III.1.4.1.3 Dégradation de l'amidon

On remarque qu'un seule isolat (E-1-41) parmi les 66 isolats étudiées à pu dégrader l'amidon, les 65 isolats se sont révélés dépourvus de l'amylase. L'activité amylolytique se traduit par la présence d'un halo clair autour de la colonie après l'addition du Lugol avec une diamètre de 2 cm, l'apparition du halo a lieu après 168h (7jours) (figure 11).



**Figure 11:** Photographies représentant le résultat positif de l'activité amylolytique de l'isolat (E-1-41) et le résultat négatif de certains isolats du sol de Goléa.

#### III.1.4.1.4 Dégradation du tween 80

C'est l'activité la moins présente par rapport aux autres activités. Un seule isolat (P-1-

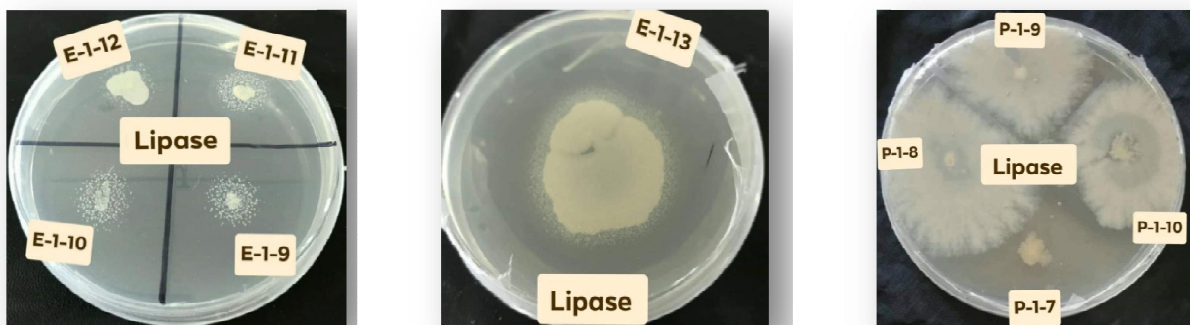
10) parmi les 66 isolats a pu sécréter l'enzyme estérase. Cette activité se traduit par l'apparition d'un halo opaque sans l'ajout d'aucun réactif avec un diamètre de 2 cm (figure 12).



**Figure 12:** Photographies représentant le résultat positif de l'activité estérasique de la souche (P-1-10) et négatif pour d'autres isolats du sol de Goléa.

#### III.1.4.1.5 Dégradation du tween 20

La mise en évidence de l'activité lipolytique des isolats du sol (E1) nous a permis de distinguer la présence d'un précipitât autour des colonies de 24 isolats et donc la dégradation des lipides (Figure 13) (E-1-1, E-1-4, E-1-9, E-1-10, E-1-11, E-1-12, E-1-13, E-1-15, E-1-22, E-1-24, E-1-28, E-1-29, E-1-31, E-1-36, E-1-37, E-1-39, E-1-40, E-1-41, E-1-42, E-1-43, E-1-44, E-1-45 et E-1-46). L'apparition du précipitât a lieu après 168h (7jours), cette dégradation est lente (figure 13).



**Figure 13:** Photographies représentant le résultat positif et négatif de l'activité lipolytique des isolats du sol de Goléa.

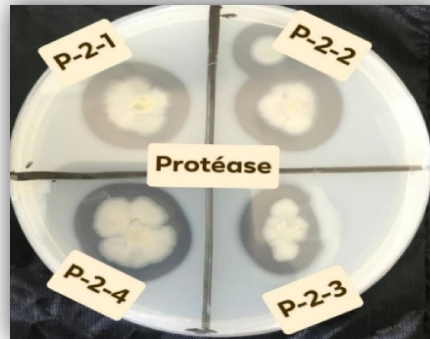
La recherche de l'activité lipolytique chez nos isolats des *Pseudomonas* spp. indique une absence totale de précipitât autour des colonies.

### III.1.4.2 La mise en évidence de l'activité enzymatique des isolats de sol du Ghailasa

#### III.1.4.2.1 Dégradation de la caséine

La mise en évidence de l'activité protéolytique chez les isolats indique l'apparition de zone claire autour des colonies bactériennes après 24h d'incubation, cela est dû à la dégradation des protéines du milieu. On a pu distinguer cette activité chez 20 isolats du sol 2 (E2) et 15 isolats des *Pseudomonas* spp. (figure 14).

Les isolats protéolytiques sont (E-2-1, E-2-3, E-2-4, E-2-5, E-2-6, E-2-7, E-2-8, E-2-9, E-2-10, E-2-11, E-2-12, E-2-13, E-2-15, E-2-16, E-2-17, E-2-18, E-2-19, E-2-22, E-2-23, E-2-24, P-2-1, P-2-2, P-2-3, P-2-4, P-2-5, P-2-6, P-2-7, P-2-8, P-2-9, P-2-10, P-2-11, P-2-12, P-2-13, P-2-14 et P-2-15).

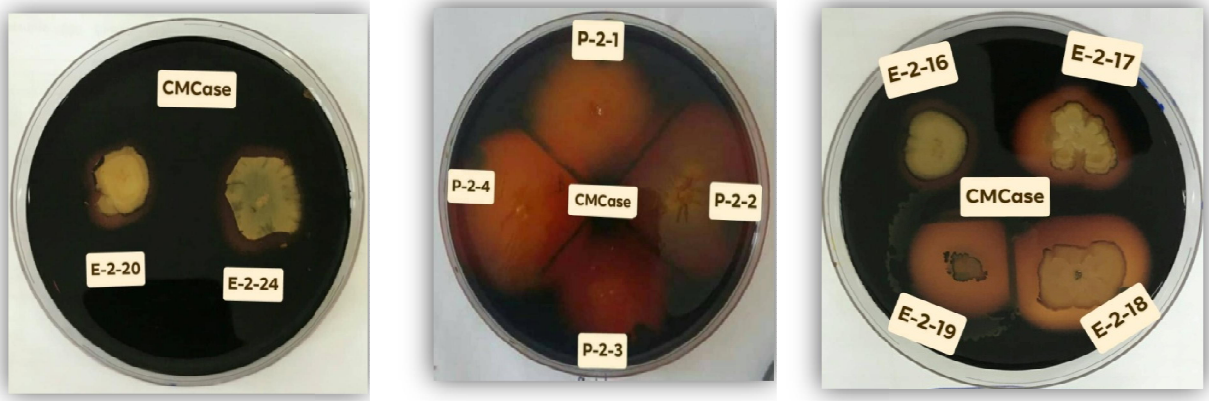


**Figure 14:** Photographie représente le résultat positif de l'activité caséinolytique de certains isolats isolées du sol de Ghailasa.

#### III.1.4.2.2 Dégradation de la carboxyméthylcellulose

Parmi les 24 isolats des bactéries de sol 2 ( E2) et 20 isolats de *Pseudomonas* spp., les isolats (E-2-1, E-2-2, E-2-19, P-2-5, P-2-6, P-2-7, P-2-8, P -2-9, P-2-12, P-2-17, P-2-18, P-2-19 et P-2-20) n'ont pas pu produire l'enzyme cellulase.

Cette activité se traduit par l'apparition d'un halo jaune orangé entourant la colonie après l'ajout du Lugol (figure 15).



**Figure 15:** Photographies représentant le résultat positif de l'activité carboxyméthylcellulosique pour les bactéries isolées du sol de Ghailasa.

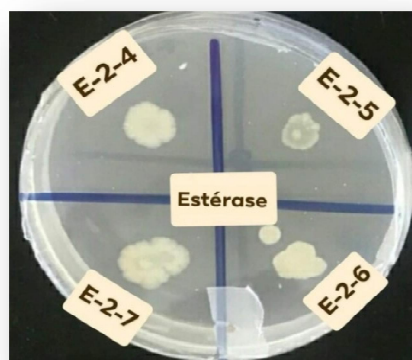
#### III.1.4.2.3 Dégradation d'amidon

La mise en évidence de cette activité se traduit par la présence d'un halo clair autour de la colonie après l'addition du Lugol. On remarque que tous les isolats bactériens étudiés n'ont pas pu dégrader l'amidon. Ils se sont révélés dépourvus de l'enzyme amylase.

#### Activité lipolytique

#### III.1.4.2.4 Dégradation du tween 80

La recherche de l'activité estérasique chez 44 isolats du sol 2 indique une absence totale de précipitat autour des colonies et donc une absence totale d'enzymes estérasique (figure 16).

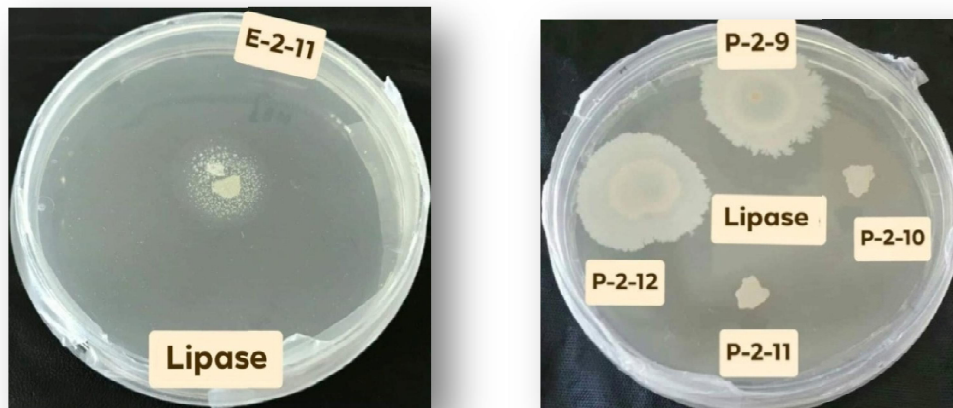


**Figure 16:** Photographie représente le résultat négatif de l'activité estérasique de certains isolats du sol de Ghailasa.

#### III.1.4.2.5 Dégradations du tween 20

La dégradation de tween 20 se distingue par la présence d'un précipitât autour des colonies. Parmi les 24 isolats des bactéries du sol 2 (E2) testés, 9 isolats (E-2-1, E-2-2, E-2-4, E-2-5, E-2-7, E-2-8, E-2-12, E-2-14 et E-2-16) ont une activité lipolytique négative (figure 17).

Durant la période d'incubation, nous avons suivi cette activité lipolytique dans chaque 24h et l'apparition du précipitât a lieu après 168h (7jours), cette dégradation est lente et la recherche de cette activité chez 20 isolats de *Pseudomonas* spp. du sol 2 (E2) indique une absence totale d'enzyme lipolytique donc pas de précipitât autour des colonies.

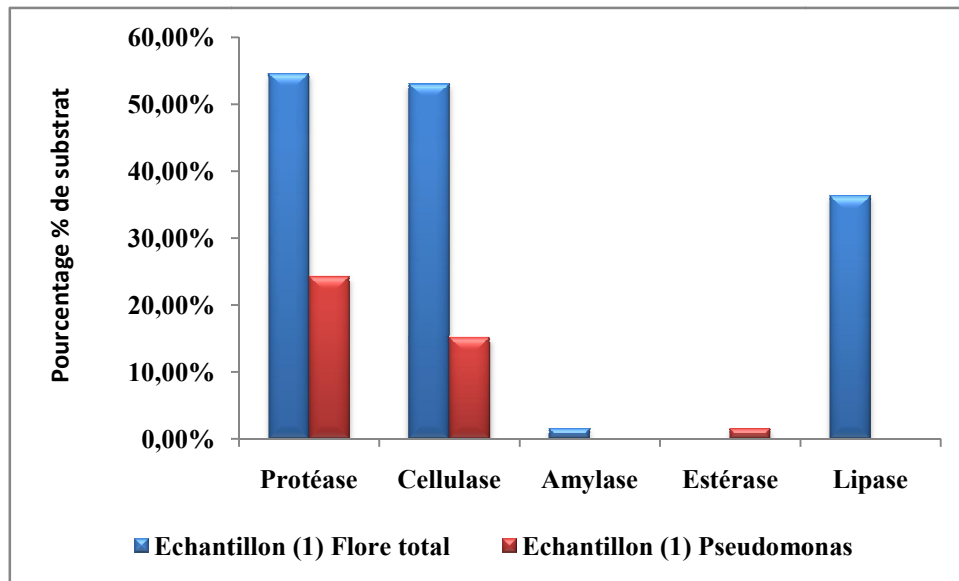


**Figure 17:** Photographies représentant le résultat positif et négatif de l'activité lipolytique pour les bactéries isolées du sol de Ghailasa.

#### III.1.5 Répartition des isolats selon la nature du substrat dégradé

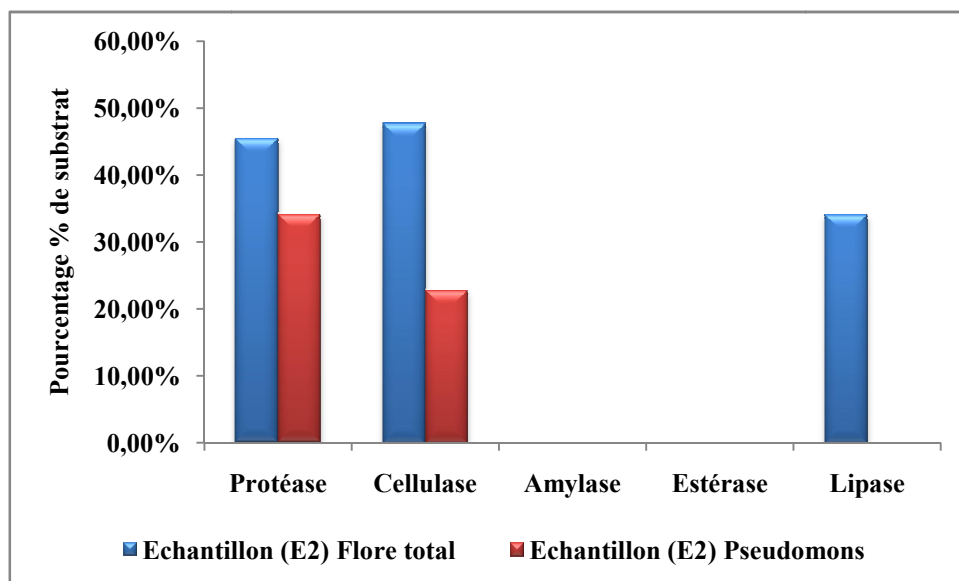
La répartition des bactéries actives selon la nature du substrat dégradé, est démontrée dans la figure 18 pour l'échantillon 1 et la figure 19 pour l'échantillon 2.

Ces résultats nous permettent de déduire pour la flore totale du sol (E1) que la caséine est le substrat le plus dégradé avec un pourcentage de 54.54% suivi par la CMC avec 53.03%. En troisième position vient le Tween 20 avec un pourcentage de 36.36%. Enfin, l'amidon est le substrat le moins dégradé de tous les substrats avec un pourcentage de 1.51%.



**Figure 18:** Histogramme représentant la répartition des bactéries isolées du sol 1 selon la nature du substrat dégradé (Goléa).

Pour les *Pseudomonas* spp. les résultats nous permettent de déduire que la caséine est le substrat le plus dégradé avec un pourcentage de 24.24% suivi par la CMC avec 15.15%. Enfin le Tween 80 qui est le moins dégradé de tous les substrats; avec un pourcentage de 1.51%.



**Figure 19:** Histogramme représentant la répartition des bactéries isolées du sol 2 selon la nature du substrat dégradé (Ghailasa).

Par conte pour la flore totale du sol (E2), la CMC est le substrat le plus dégradé avec un pourcentage de 47.72% suivi par la caséine avec 45.45%. En 3eme position, viennent le Tween 20 avec un pourcentage de 34.09%.

Pour les *Pseudomonas* spp. de l'échantillon 2, la caséine est le substrat le plus dégradé avec un pourcentage de 34.09% suivi par la CMC avec 22.72%. Les isolats de l'échantillon 2 ne produisent ni l'amylase ni l'estérase ni la lipase.

### **III.1.6 Répartition des isolats selon le nombre des enzymes produites**

La répartition des isolats actifs selon le nombre des enzymes produites, est démontrée dans les figures 20, 21, 22 et 23 en respectivement, *Pseudomonas* spp. la flore totale du sol.

Les isolats nommés (E-1-9, E-1-10, E-1-12, E-1-13, E-1-15, E-1-17, E-1-22, E-1-24, E-1-28, E-1-31, E-1-37, E-1-41, E-1-44, E-1-45, E-1-46, E-2-3, E-2-6, E-2-9, E-2-10, E-2-12, E-2-13, E-2-15, E-2-17, E-2-18, E-2-22, E-2-23 et E-2-24) viennent en 1ere position avec un pourcentage de (22.73%, 10%) en respectivement l'échantillon (E1, E2), elles ont pu produire trois enzymes différentes; protéase, cellulase et lipase. Tendis que pour l'isolat (E-1-41), c'est la cellulase, amylase et lipase.

Les isolats (E-1-1, E-1-5, E-1-6, E-1-7, E-1-8, E-1-11, E-1-14, E-1-18, E-1-19, E-1-20, E-1-21, E-1-26, E-1-29, E-1-30, E-1-32, E-1-33, E-1-36, E-1-38, E-1-39, E-1-42, E-1-43, P-1-1, P-1-2, P-1-3, P-1-4, P-15, P-1-8, P-1-10, P-1-11, P-1-13, P-1-14, P-1-15, P-1-16, P-1-17, P-1-18, P-1-19, E-2-4, E-2-5, E-2-7, E-2-8, E-2-12, E-2-16, E-2-19, E-2-20, E-2-21, P-2-1, P-2-2, P-2-3, P-2-4, P-2-10, P-2-11, P-2-13, P-2-14 et P-2-15) occupent la deuxième position avec un pourcentage de 51.51% pour les isolats de l'échantillon E1 et 17.27% pour les isolats de l'échantillon 2, ces isolats ont pu produire 02 enzymes: le protéase, cellulase. La protéase et l'estérase pour l'isolat (P-1-10).

En dernière position viennent les isolats (E-1-2, E-1-3, E-1-4, E-1-16, E-1-25, E-1-27, E-1-34, E-1-35, E-1-40, P-1-6, P-1-7, P-1-11, P-1-12, P-1-20, E-2-1, E-2-14, P-2-5, P-2-6, P-2-7, P-2-8, P-2-9, P-2-12 et P-1-16) avec un pourcentage de (24.24%, 8.18%) en respectivement l'échantillon (E1, E2) par la production d'une seule enzyme qui est soit la protéase ou bien la cellulase.

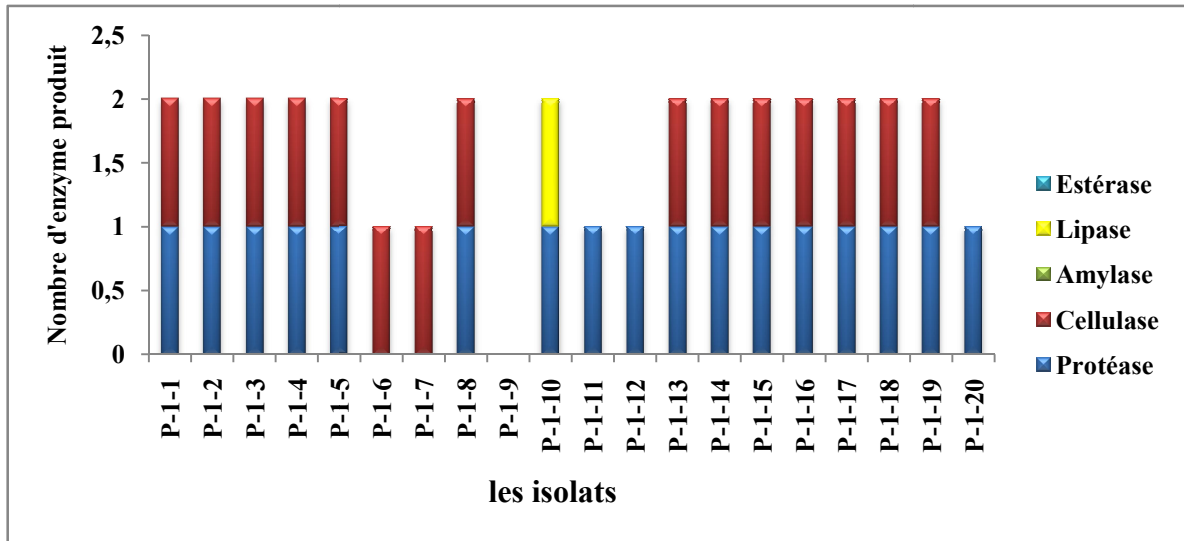


Figure 20: Histogramme représentant la répartition des bactéries (*Pseudomonas* spp.) de l'échantillon 1 selon le nombre des enzymes produites.

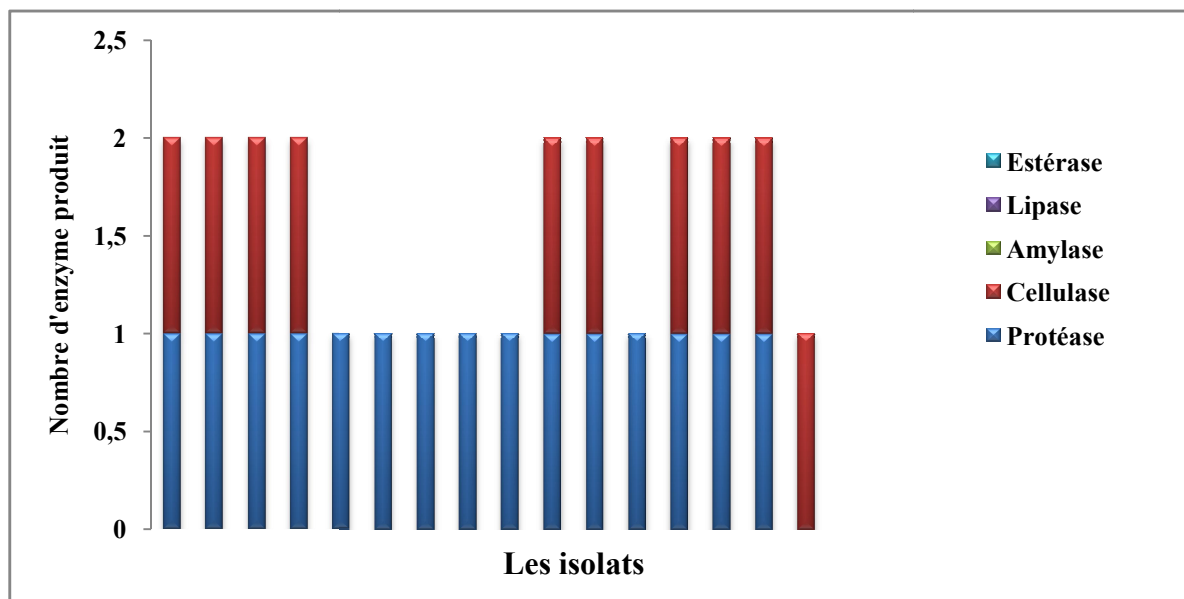


Figure 21: Histogramme représentant la répartition des bactéries (*Pseudomonas* spp.) de l'échantillon 2 selon le nombre des enzymes produites.

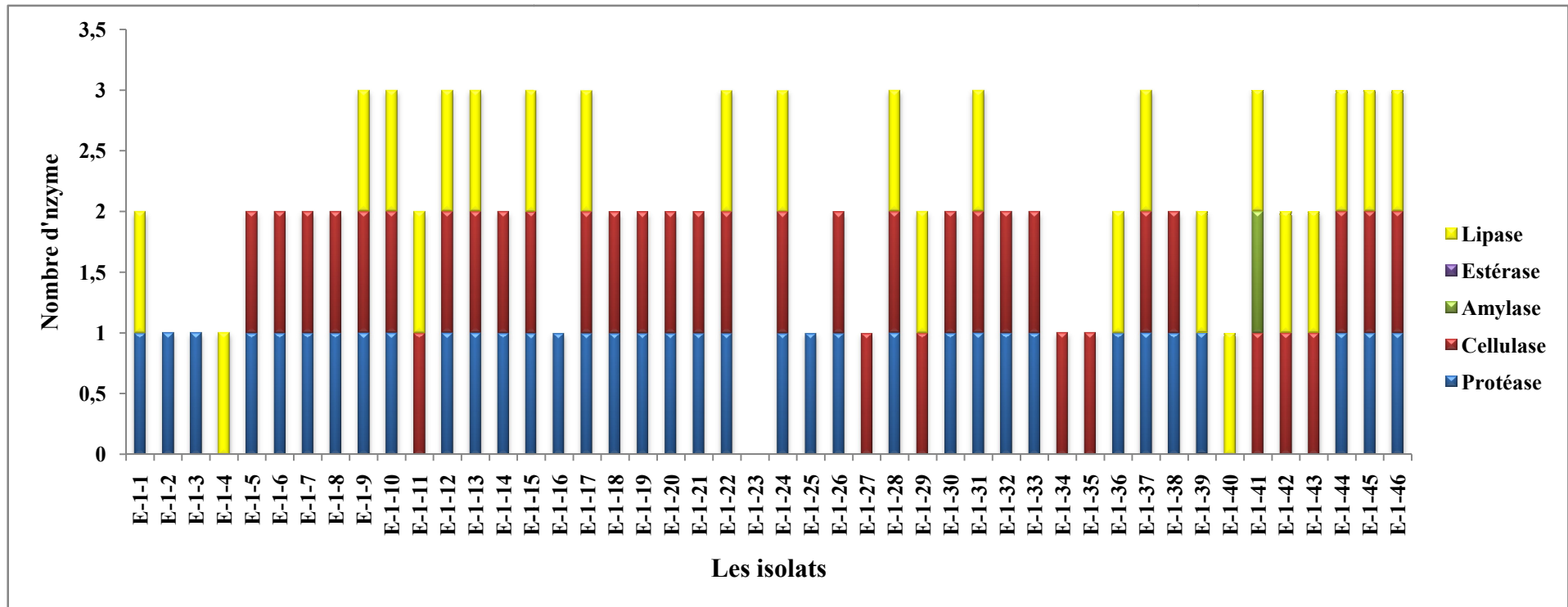
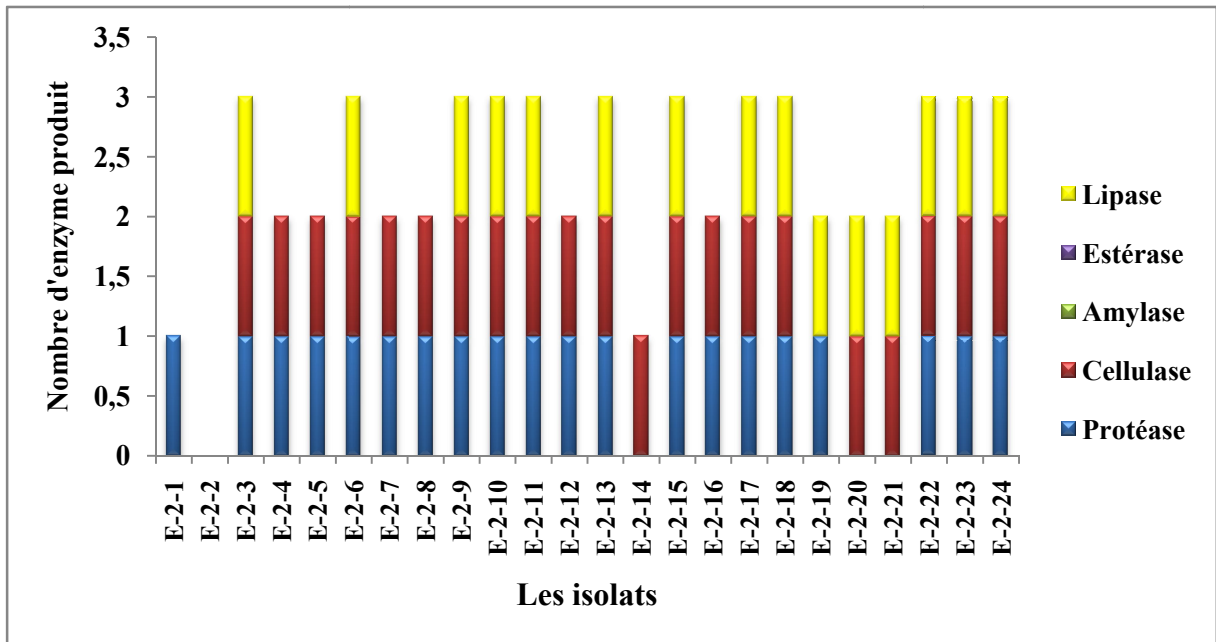


Figure 22: Histogramme représentant la répartition des bactéries isolées de l'échantillon 1 selon le nombre des enzymes produites.



**Figure 23:** Histogramme représentant la répartition des bactéries isolées de l'échantillon 2 selon le nombre des enzymes produites.

### III.1.7 Analyse statistique

#### III.1.7.1 Répartition des isolats selon l'indice enzymatique

L'indice enzymatique a été déterminé entre le diamètre du halo enzymatique et le diamètre de la colonie (**Herculano et al., 2011**). La présence du halo ou zone dégagée autour de la culture était l'indicateur d'activité hydrolytique mis en évidence par la sécrétion d'enzymes par des isolats (**Azzouz, 2015**).

Grâce à l'indice enzymatique, nous avons pu classer les isolats en fonction de leurs activités. Les isolats qui représentent un indice enzymatique  $\leq 1$  indiquent une activité faible, l'activité moyenne est indiquée lorsque l'indice enzymatique est limité au domaine [1-3] alors que lorsque l'indice enzymatique est  $\geq 3$  les isolats représentent une fort activité (tableaux VII, VIII, IX et X).

**Tableau VII:** Les indices enzymatiques des bactéries (flore totale) isolées du sol 1 (Goléa).

Code d'isolat	Protéase	Cellulase	Amylase	Lipase	Estérase
	ID	ID	ID	ID	ID
E-1-1	2.33				1.31
E-1-2	1.66				
E-1-3	2.26				
E-1-4					9
E-1-5	2.22	1.43			
E-1-6	1.8	1.58			
E-1-7	2.15	1.43			
E-1-8	2.25	1.33			
E-1-9	2.25	1.54			1.12
E-1-10	2.25	1.67			7.5
E-1-11		1.64			4.2
E-1-12	2.08				2.17
E-1-13	1.46	1.45			1.38
E-1-14	2.47	1.05			
E-1-15	2.75	2			2
E-1-16	1.45				
E-1-17	1.5	1.6			2.4
E-1-18	1.66	1.3			
E-1-19	1.75	1.6			
E-1-20	1.66	2			
E-1-21	2.13				
E-1-22	1.58	1.5			2.07
E-1-24	2.5	5.5			1.33
E-1-25		2.7			
E-1-26	1.8	2			
E-1-27		1.5			
E-1-28	1.8	2.21			7
E-1-29		2.57			5
E-1-30	3	1.67			
E-1-31	1.66	1.6			4
E-1-32	2.25	1.67			
E-1-33	1.38	1.69			
E-1-34		1.44			
E-1-35		2.6			
E-1-36	1.74				1.6
E-1-37	3.75	1.47			1.92
E-1-38	2.14	1.92			
E-1-39	1.8				3
E-1-40					2.6
E-1-41		2	2		1.93
E-1-42		2.57			3
E-1-43		1.39			2.53
E-1-44	2.5	1.39			2.14
E-1-45	1.55	1.46			1.92
E-1-46	1.81	1.35			1.8

IE: Indice Enzymatique.

**Tableau VIII:** Les indices enzymatiques des bactéries (flore totale) isolées du sol 2 (Ghailasa).

Code d'isolat	Protéase	Cellulase	Amylase	Lipase	Estérase
	IE	IE	IE	IE	IE
E-2-1	1.93				3.67
E-2-3	2.6	1.37			1.08
E-2-4	1.64	1.5			
E-2-5	2.2	3.16			
E-2-6	2.35	2.5			1.8
E-2-7	3	1.8			
E-2-8		1.27			
E-2-9	2.86	1.19			1.67
E-2-10	2.5	1.5			2
E-2-11	1.48	1.67			4.8
E-2-12	1.55	1.31			
E-2-13	2	1.5			1.91
E-2-14		1.69			
E-2-15	2.89	1.32			3.75
E-2-16	1.6	1.77			
E-2-17	2.6	1.74			1.87
E-2-18	1.83	1.48			1.92
E-2-19	1.42				2.2
E-2-20		1.44			4
E-2-21		10			3
E-2-22	10	1.4			2
E-2-23	3.75	3			4.5
E-2-24	1.52	1.32			12.5

**IE:** Indice Enzymatique.

**Tableau IX:** Les indices enzymatiques des *Pseudomonas* spp. isolés du sol 1 (Goléa).

Code d'isolat	Protéase	Cellulase	Amylase	Estérase	Lipase
	ID	ID	ID	ID	ID
P-1-1	1.58	3.5			
P-1-2	1.73	2			
P-1-3	1.83	2			
P-1-4	1.9	1.5			
P-1-5	1.9	3.6			
P-1-6		1.25			
P-1-7		5			
P-1-8	2.08	2.33			
P-1-10	1.71		2		
P-1-11	2				
P-1-12	1.47				
P-1-13	1.6	4			
P-1-14	2.5	1.93			
P-1-15	1.89	7.4			
P-1-16	1.5	3.5			
P-1-17	1.83	2.9			
P-1-18	1.64	2			
P-1-19	2	8.33			
P-1-20	1.57				

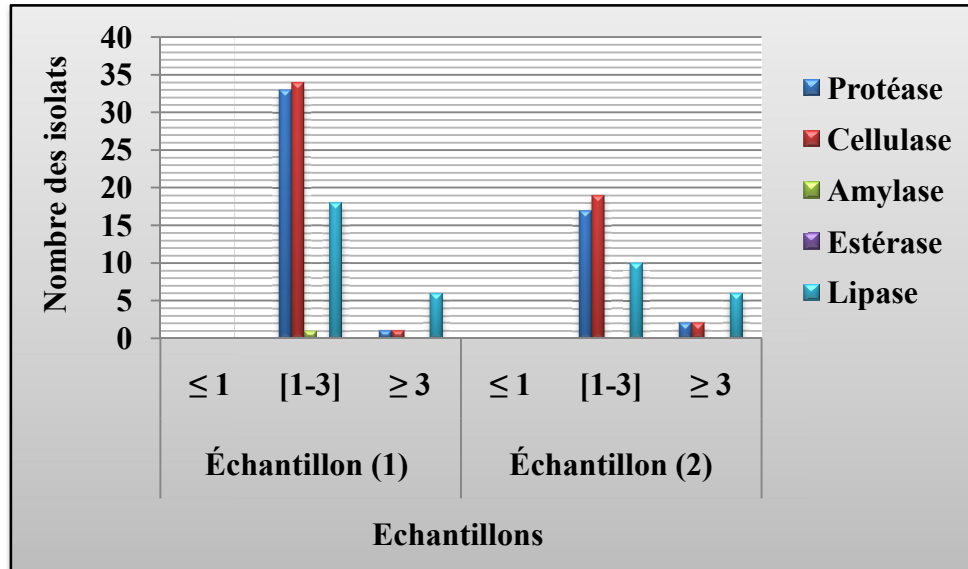
IE: Indice Enzymatique.

**Tableau X:** Les indices enzymatiques des *Pseudomonas* sp. isolés du sol 2 (Ghailasa).

Code d'isolat	Protéase	Cellulase	Amylase	Estérase	Lipase
	ID	ID	ID	ID	ID
P-1-1	1.5	1.13			
P-1-2	1.15	4			
P-1-3	2.86	5			
P-1-4	3.11	1.95			
P-1-5	6				
P-1-6	2.6				
P-1-7	3				
P-1-8	2.5				
P-1-9	2.5				
P-1-10	2	1.65	2		
P-1-11	1.79	2			
P-1-12	2.2				
P-1-13	7.16	3.2			
P-1-14	1.67	1.5			
P-1-15	1.92	3.6			
P-1-16		2			

IE: Indice enzymatique.

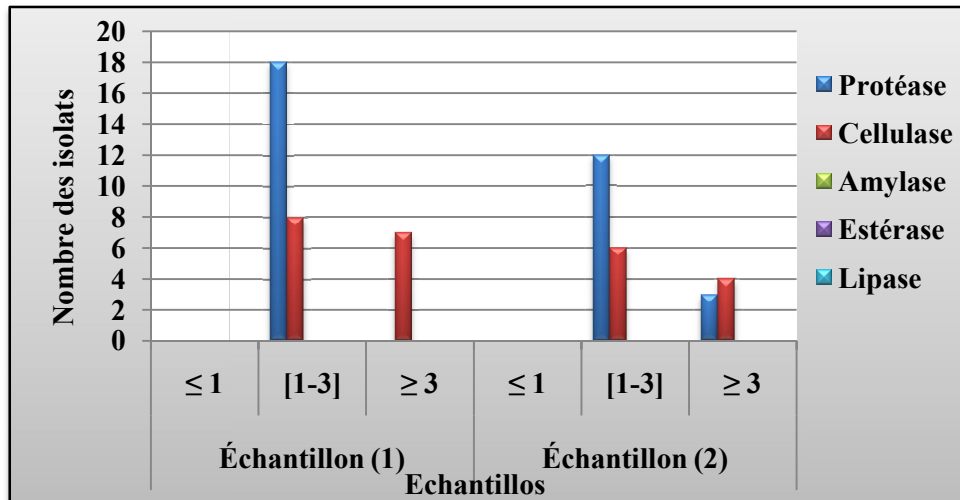
La comparaison des profils de l'indice enzymatique selon la provenance des isolats (échantillons du sol (E1 et E2)) est présentée dans les figures 24 pour la flore totale du sol et la figure 25 pour les *Pseudomonas* spp..



**Figure 24:** Histogramme représentant la répartition des bactéries isolées du sol selon l'indice enzymatique (Goléa, Ghailasa).

Selon l'histogramme on observe une absence totale d'isolats à faible indice enzymatique  $\leq 1$  pour les deux échantillons. Alors que nous avons réussi à obtenir 33 isolats du sol (E1) et 17 isolats du sol (E2) ont une activité protéasique moyenne, 34 isolats du sol (E1) et 19 isolats du sol (E2) pour une moyenne activité cellulosique et 18 isolats du sol (E1) et 10 isolats du sol (E2) possèdent une activité lipolytique moyenne avec l'indice enzymatique situé entre [1-3]. L'activité amylolytique moyenne est observée seulement chez l'isolat (E-1-41) dont l'indice enzymatique est égal à 2.

Concernant la forte activité enzymatique ( $\geq 3$ ), les six isolats (E-1-37, E-2-22), (E-1-24, E-2-1) et (E-1-4, E-2-24) ont montré les potentiels hydrolytiques les plus élevés (caséinase, cellulase et lipase) avec les indices enzymatiques les plus élevés. D'autres isolats, à savoir E-2-22, E-2-5, E-1-10, E-1-11, E-1-28, E-1-29, E-1-31, E-2-1, E-2-11, E-2-15, E-2-20, et E-2-23 se sont également avérés capables de produire certaines enzymes étudiées, mais avec un indice enzymatique légèrement inférieur à celui de ces six isolats.



**Figure 25:** Histogramme représentant la répartition des *Pseudomonas* spp. isolées du sol selon l'indice enzymatique (Goléa, Ghailasa).

Pour les *Pseudomonas* spp. et selon l'histogramme on observe aussi une absence totale d'isolats à faible indice enzymatique  $\leq 1$  pour les deux échantillons. Alors que nous avons réussi à obtenir 18 isolats du sol (E1) et 12 isolats du sol (E2) ont une activité protéasique moyenne, 8 isolats du sol (E1) et 6 isolats du sol (E2) pour une moyenne activité cellulosique et des indices enzymatiques situés entre [1-3]. Seulement l'isolat (P-1-10) qui a montré un indice enzymatique moyen égal à 2 pour une activité éstérasique parmi les 40 isolats de *Pseudomonas*.

Concernant la forte activité enzymatique  $\geq 3$ , les isolats de sol (E1) n'ont montré aucune activité protéasique contrairement à ceux isolés à partir du sol (E2), trois isolats (P-2-4, P-2-5 et P-2-13) ont respectivement montré les indices enzymatiques protéasique les plus élevés (3.11, 6, 7.16). Pour l'activité cellulosique, 11 isolats possèdent (7 isolats du sol E1 et 4 isolats du sol E2) possèdent les valeurs des indices enzymatiques maximales où pour les isolats (P-1-19, P-2-3), les indices enzymatiques étaient de 5 et 8.33 respectivement.

## III.2 Discussion

Dans cette présente étude, 2 échantillons du sol de différentes régions de la wilaya de Bordj Bou Arreridj (Goléa et Ghailasa) ont été étudiés. Les échantillons du sol sont prélevés à une profondeur allant de 15 à 20 cm dans des conditions stériles, dans le but d'isoler les bactéries productrices d'enzymes d'intérêt agricoles. 110 isolats sont isolés et séparés au départ. Chaque isolat est purifié puis testé pour la présence d'activités enzymatiques.

Nombreux sont les chercheurs qui ont rapporté l'aptitude des bactéries à métaboliser plusieurs et différents composés tels que les sucres, les lipides, les protéines et les acides aminés par production de divers enzymes extracellulaires (**Das et al., 2012 et Minotto et al., 2014**). L'utilisation des bactéries pour la production d'enzyme dans le sol dans le but d'améliorer la biodisponibilité des nutriments pour la plante a été étudiée par plusieurs auteurs et présente beaucoup d'avantages.

Les actinomycètes sont fréquemment bactériolytiques grâce à des enzymes hydrolytiques capables de fragmenter les peptides de la paroi comme, les chitinases, les amylases et les protéases. L'équipement enzymatique des actinomycètes est très diversifié, il est à l'origine du rôle écologique majeur de ces organismes. Leurs variétés et leurs importance quantitative, dépendent de nombreux facteurs comme le pH, la matière organique, les saisons, traitement agricole, etc (**Bouzigha et Bouchiba, 2017**).

*Streptomyces* est le genre le plus étudié des actinomycètes. Ce genre est capable de produire une large variété d'enzymes (**Jeffrey et Azrizal, 2007**).

Concernant les *Pseudomonas*, ils forment un large groupe colonisant le sol, les plantes et l'eau. Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux appartenant principalement aux genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve un peu par tout, particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes. Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique, elles sont connues pour produire les composés antimicrobiens et les enzymes extracellulaires (lipase, estérase, xylanase, pectinase, amylase, protéase et cellulase) (**Allaire, 2005**).

L'étude enzymatique a montré que le bagage enzymatique des souches est très important, elles sont capables d'hydrolyser le lait écrémé, la CMC, l'amidon, tween 80 et le tween 20. Ils sont dotés, principalement d'une activité protéolytique. L'activité hydrolytique la plus abondante est celle de la dégradation de lait écrémé et la CMC. Ce bagage enzymatique est directement influencé par la disponibilité des nutriments dans l'environnement direct, et fait partie de l'adaptation de ces microorganismes à leur milieu naturel (**Cohen, 2011**).

110 isolats ont été isolés et purifiés dans cette étude. Parmi cette microflore, 103

isolats soit 93.63 % de cette population se sont révélés producteurs d'enzymes. Deux souches dénommées E-1-41 et P-1-10 ont présenté respectivement une activité amylolytiques et estérasique dans cette étude.

Les protéases sont parmi les enzymes les plus importantes, elles constituent plus de 60% des applications industrielles totales comme agents blanchisseurs dans les détergents ou dans la synthèse des peptides (**Dharumadurai et Jiang, 2016**). Elles sont utilisées dans le domaine alimentaire, l'industrie fromagère, les détergents, l'industrie de soie, domaine de la pharmacologie, production de médicaments et dans l'agriculture (**El-Safey et Abdul-raouf, 2004**).

La dégradation des protéines par les protéases microbiennes joue un rôle important dans le cycle d'azote au niveau du sol en le rendant disponible pour les plantes et les micro-organismes (**Petit et Jobin, 2005**).

Concernant les 103 isolats actifs, 88 isolats présentent une activité protéasique positive. Des études portant sur les protéases des bactéries du sol ont montré que les actinomycètes sont moins exploités pour l'activité protéasique. Le genre *Bacillus* en comparaison avec les souches d'actinomycètes, certaines sont productrices d'enzymes protéolytiques, d'autres non (**Ningthoujam et al., 2009**).

Pendant de nombreuses années, les bactéries dégradant la cellulose ont été ciblées et caractérisées pour l'obtention de cellulases plus efficaces (**Otajevwo et Aluyi, 2011**). Différentes cellulases ont été mises en évidence dans différents genres appartenant aux *actinomycètes*, il s'agit principalement de *Streptomyces* (**Jang and Chang, 2005**).

Les résultats obtenus montrent que l'activité cellulolique est observée chez des isolats testés. D'après **Maki et al. (2011)**, Plusieurs souches de *Bacillus* et de *Microbacterium* produisent les cellulases. La capacité à dégrader la cellulose semble être essentielle dans la dégradation de la plupart des structures formant les parois végétales, si bien que les bactéries non cellulolytiques ont une capacité limitée à solubiliser ce genre de substrat (**Reffas, 2017**).

La dégradation de la cellulose joue un rôle clé dans le cycle de carbone (**Lee et al., 2007**), Selon **Lu et al (2005)**, les espèces de *Bacillus* jouent un rôle important dans la biodégradation et la bioconversion des composés de haut poids moléculaires, *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* sont fréquemment signalées parmi les espèces cellulolytiques.

La synthèse des enzymes amyliques par les bactéries du sol permet une dégradation de la matière organique dans la nature et ainsi fournir des éléments minéraux que les plantes vont l'utiliser pour leur croissance. **Shukla et Varma (2010)** ont montré que les espèces du genre *Bacillus* sont capables de produire des métabolites ayant un effet bénéfique sur la santé des plantes, les métabolites à activité antibiotiques (contre les phytopathogènes) et les enzymes extracellulaires (amylases, chitinases...etc.).

Dans ce travail, un seul isolat (E-1-41) est révélée producteur d'amylase. Mais *Pseudomonas* spp. ne présente pas cette activité malgré que plusieurs chercheurs ont pu isoler des souche productrice d'amylase, **Whipps (2001); Siddiqui (2005) et Viollet (2010)** ont trouvé que les *Pseudomonas* productrices d'amylase stimulent la croissance et la santé des plantes.

Dans leur étude sur *Bacillus* sp., **Obi et Odibo (1984)** ont révélé une production de quantités considérables en  $\alpha$  et  $\beta$ -amylases. Ils ont aussi déterminé les différents paramètres (température et pH) influençant la synthèse des amylases par les actinomycètes du sol dans le milieu de culture. Elles pourraient donc être utilisées dans des processus d'industries de détergents et d'hydrolyse d'amidon (**Karan et al., 2012**).

Les estérases et les lipases ont été mises en évidence, dès 1901, chez des bactéries telles que *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus* et *Bacillus fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* (**Fickers et al., 2008**).

Parmi les 103 isolats, (P-1-10) est le seul isolat qui hydrolyse le tween 80, et 35.45 % d'isolats testés ont révélé des activités estérasique. La synthèse des lipases et des estérases par les isolats est une activité qui contribue à la dégradation de la matière grasse et par conséquent, les souches pourraient participer dans le recyclage, et fournissent les éléments minéraux nécessaires aux plantes.

Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites chez les bactéries à Gram + telles que *Bacillus* que chez les bactéries à Gram – telle que *Pseudomonas*, l'activité lipolytique est trop répondu chez les bactéries qui est plus proche a notre résultat. Selon les travaux de **Lelie et al. (2005)** le tween 80 a eu un effet inhibiteur sur l'activité de l'estérase ce qui peut expliquer l'absence de la production de l'estérase par les isolats.

La répartition des bactéries actives selon la nature du substrat dégradé pour les 110 isolats qui sont isolée à partir de deux sites (Goléa et Ghailasa) nous permettent de montrer le profil hydrolytique enzymatique des isolats. Il a été constaté que parmi tous les enzymes sélectionnés, la caséinase était amplement produite par un pourcentage de 80% des isolats, suivie de la carboxymethylcellulase (CMCase) avec 73.63%, Ces résultats ressemblent à ceux présentées par **Tabbassum et al (2015)** où 70,2% des souches ont été capables de dégrader la cellulose en tant que seule source de carbone.

En 3eme position, viennent le Tween 20 avec un pourcentage de 35.45 %. **Asad et al (2011)** ont signalé 74% de souches bactériennes productrices de lipase.

Enfin, l'amidon et le Tween 80 sont les substrats les moins dégradé de tous les substrats utilisés avec un pourcentage de 0.91%, Ces résultats ne ressemblent pas à ceux présentés par **Narayan et al en (2008)** où ils représentent jusqu'à 94,6% des souches étudiées dans la configuration de recherche actuelle se sont révélées être amylolytiques. Les estérases sont largement utilisées dans les industries des détergents, de l'alimentation, des produits pharmaceutiques et des cosmétiques, mais nos résultats sont loin de ceux rapportés par **Tabbassum et al (2015)** lors du criblage de ces enzymes, les isolats à 97,2% ont montré leur capacité à produire cette enzyme.

Il est à noter que parmi les souches productrices d'hydrolases, 24 ne produisent qu'un seul type (18 souches protéolytiques, 3 souches lipolytiques et une souche cellulolytiques), d'autres combinent deux à trois activités hydrolytiques; 51 isolats produisent deux enzymes et 28 isolats produisent trois enzymes. À l'échelle industrielle, la production simultanée d'enzymes polyvalentes par une seule souche peut aider à réduire les coûts et la durée des installations de production.

Concernant toujours l'hydrolyse des polymères testés, certaines souches ont montré des activités enzymatiques faibles par estimation de la surface de la zone d'hydrolyse produite, ce qui peut être expliqué par le fait que ces tests de mise en évidence ne donnent pas une appréciation quantitative de l'activité enzymatique. Les résultats confirment que les souches ont une activité enzymatique, mais ne nous permettent pas de dire si l'activité est sécrétée ou non. On remarque aussi une différence de clarté des zones très claire pour les souches qui ont une forte production d'enzyme, par contre les zones non claires pourraient être dues à la production d'enzyme mais pas à grande concentration.

La méthode de diffusion radiale dans les milieux solides indiquait l'activité sous forme qualitative, en corrélation directe entre les diamètres du halo de dégradation et la colonie (indice enzymatique). L'indice enzymatique est un outil pratique qui facilite et accélère la sélection et la comparaison de la production enzymatique de différents isolats microbiens (**Mazzucotelli et *al.*, 2013**).

Toutefois, dans les résultats obtenus, il a été observé que l'isolat E-2-22 a démontré le meilleur indice enzymatique (10) pour la caséinase, une meilleure production de la carboxyméthylcellulase qui a été observée chez l'isolat E-2-21 avec IE égal à 10. Pour l'amylase et l'estérase, les isolats E-1-41 et P-1-10 en respectivement considèrent comme productrice de l'enzyme avec un indice enzymatique égal 2.

Concernant l'isolat E-2-24, la méthode de diffusion radiale montrés sa capacité à produire la lipase avec un meilleur indice enzymatique égal 12.5.

## Conclusion

---

Dans cette étude, deux échantillons sont prélevés à partir du sol riche en matière organique en décomposition dans la région de Goléa et Ghailasa dans la wilaya de Bordj Bou Arreridj. Ces échantillons ont fait l'objet d'un isolement des bactéries d'intérêt industriel productrices de différentes enzymes hydrolytiques tels que la protéase, cellulase, l'amylase, l'estérase et lipase.

46 isolats différents sont isolés a partir de la région de Goléa (sol 1) et 24 isolats à partir de la région de Ghailasa (sol2) sur le milieu PCA en plus de 40 (20 pour l'échantillon 1 et 20 pour l'échantillon 2) isolats de *Pseudomonas* spp. isolés a partir des deux régions sur les milieux King A et King B.

À la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que:

- Toutes les souches étudiées ont montré au moins une activité enzymatique, ce qui démontre leur importance;
- Pour les isolats du sol 1, la caséine est le substrat le plus dégradé avec un pourcentage de 54.54% suivi par la CMC avec 53.03% ensuite le tween 20 avec 36.36%. Enfin, l'amidon est le substrat le moins dégradé de tous les substrats avec un pourcentage de 1.51%;
- Dans les échantillons du sol 2, l'activité carboxyméthylcellulosique représente le pourcentage le plus élevé avec 47.72% suivi de l'activité protéolytique avec 45.45% et enfin l'activité lipolytique avec 34.09% aucune des souches n'a pu produire l'amylase et l'estérase;
- On se qui concerne les isolats de *Pseudomonas* spp. du sol 1 la caséine est le substrat le plus dégradé avec 24.24% suivi par la CMC avec 15.15% ensuite le tween 80 avec 1.51%, finalement ces souches n'ont pas pu produire l'amylase et la lipase.
- Pour les isolats de *Pseudomonas* spp. du sol 2 l'activité protéolytique représente 34.09%, ensuite la cellulose avec un pourcentage de 22.72%, cependant ces isolat ne dégradent ni le tween 80 ni le tween 20 ni l'amidon.

D'après ces résultats préliminaires, les bactéries isolées méritent d'autres études plus approfondies comprenant l'identification des bactéries productrices, et l'évaluation quantitative de la production des déférentes enzymes.

# Références

**AISSAOUI. N., 2013.** Etude de molécules d'antibiotiques biosynthétisées par un bactérie extrémophile issue d'une sebkha Algérienne d'El Goléa. Mémoire de Magister en Maitrise de la Qualité Microbiologique et du Développement Microbien. Université Aboubekr Belkaid - Tlemcen, p 26.

**AKACEM. O., 2012.** Activité protéolytique des Pseudomonas d'origine hospitalière Au niveau des services de réanimation et d'urologie (C.H.U –Tlemcen). Mémoire de Master en Microbiologie. Université Aboubekr Belkaid - Tlemcen, pp 1-4.

**ALLAIRE. M., 2005.** Diversité fonctionnelle des Pseudomonas producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel. Mémoire du grade de Maitre de Science (M.Sc) en Microbiologie Agricole. Faculté des études supérieures. Université Laval, Québec. p 5.

**ASAD. W et al., 2011.** Extracellular enzyme production by indigenous thermophilic bacteria: partial purification and characterization of  $\alpha$ -amylase by Bacillus sp. WA21. *Pakistan Journal of Botany*, **43** (2), 1045-1052.

**ATHEL. C.B et al., 2005.** Cinétique enzymatique. Edition EDP Sciences. London. (Collection Grenoble Sciences, N°. 2), ISBN: 2-86883-742-5, pp 7-55.

**AZZOUA. Z., 2015.** Production de cellulases et de xylanase fongique par fermentation solide et liquide à base de paille et de son de blé. Mémoire de Magister en Sciences Alimentaires. Université Abderrahmane Mira - Béjaia (UAMB). p 45.

**BARROS. M., 2010.** Seed lipases: source, applications and propertes - a review. Vol. 27. N°. 01. Printed in Brazil. ISSN 0104-6632. p 16.

**BEDJADJ. S., 2011.** Contribution à l'étude des caractéristiques microbiologiques des sols dans la région de Ouargla (Cas de l'exploitation de l'Université de Ouargla). Mémoire de stage pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en sciences Agronomiques. Université Kasdi Merbah - Ourgla. p 6.

**BELHADI. F., AIT MEDDOUR. K., 2012.** Isolement et caractérisation des bactéries productrices d'enzymes à intérêt agricole à partir du sol et d'algues marines. Mémoire de Master: Ecologie Microbienne et Environnement. Département de Microbiologie. Université Abderrahmane Mira - Béjaia (UAMB). pp 3-12.

**BELMESSIKH. A., 2011.** Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister en Biotechnologie microbienne. Université Frères Mentouri - Constantine. pp 5-13.

**BENCHIHEUB. M., 2015.** Etude des protéases de quelques plantes endémiques. Purification, propriétés, mécanisme d'action et applications technologiques. Thèse de Doctorat en Biotechnologie Végétale. Université Constantine I. p16.

**BENKERROU. F., HAMAILI. K., 2012.** Etude de la croissance et la production des cellulases par *Bjerkandera* sp. sur le son et la paille de blé. Mémoire de stage pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Génie biologique. Université Abderrahmane MIRA - Bejaia. pp 8-10.

**BENMAMMAR. Y et al., 2016.** Étude de quelques activités enzymatiques d'une collection d'actinomycètes. Mémoire de Magister en Écologie microbienne. Université Frères Mentouri - Constantine. pp 4-19.

**BENSMIRA. S., 2006.** Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrême (sol et sebkha de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel. Mémoire de Magister en Biochimie et Microbiologie Appliquées. Université Frères Mentouri - Constantine. pp 11-15.

**BIER. M., 1955.** Méthodes in enzymology, Lipases, Edition, Jungsan Sohn. Vol. 1, N°. 106. p 627.

**BORNSCHEUER. T., 2002.** Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, **9** (26), 73-81.

**BOUZIGHA. N., BOUCHIBA. S., 2017.** Diversité métabolique et physiologique de quelques souches d'actinomycètes. Mémoire de Master en Microbiologie générale et biologie moléculaire des microorganismes. Université Mentouri - Constantine, p 6.

**CARRIM et al., 2006.** Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* cham. (Carobinha-do-campo). *Journal of brazilian archives of biology and technology*, **49** (3), 353-359.

**COHEN. G.N., 2011.** *Microbial Biochemistry*. Edition Springer Dordrecht Heidelberg London, New York. (Collection Springer Science+Business Media B.V) ISBN 978-90-481-9436-0. pp 163, 164.

**DAKHMOCHE. D.S., 2016.** Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides. Thèse de doctorat Co-tutelle. Laboratoire de transformations intégrées de la matière renouvelable. Université Mentouri - Constantine, p 35.

**DARI. R., 2013.** Dénombrement de la biomasse microbienne des sols arides exemple d'un sol salé sous deux types de cultures. Mémoire de stage pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en sciences Agronomiques. Université Kasdi Merbah - Ourgla. pp 4-26.

**DAS. A et al., 2012.** Enzymatic Screening, Antibacterial Potential and Molecular Characterization of Streptomycetes Isolated from Wayanad District in Kerala, India. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, **2** (1), 201-210.

**DAVET. P., 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. Edition Quae, INRA. Paris Cedex 07. ISBN: 2-7380-0648-5. p 94-95.

**DHARUMADURAI. D., JIANG. Y., 2016.** Actinobacteria - Enzymes and Phytohormones from Micromonospora. In: Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications. Édition BoD – Books on Demand. Croatia, ISBN: 9789535122487, p 298.

**DUPONNOIS. R et al., 2013.** Des champignons symbiotiques contre la désertification écosystèmes méditerranéens, tropicaux et insulaires. IRD Editions (INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT). Marseille. ISBN: 978-2-7099-1827-5. p 512.

**EL-SAFEY. E., ABDUL-RAHOUF. U.M., 2004.** Production, purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *International Conferences For Development And The Environment In The Arab World*, **1** (1): 1-30.

**FARHAT. H., LAKLOUKA. N., 2015.** Contribution à l'étude de l'alpha amylase levurienne: optimisation des conditions de production. Mémoire de Master Académique en Biochimie Appliquée. Université Mentouri - Constantine, pp 3-8.

**FAUGIER. A., 2010.** Diversité bactérienne des sols: accès aux populations à effectifs moniritaires «the rare biosphère». Thèse de doctorat. Laboratoire Ampère (CNRS UMR5005). L'école doctorale électronique, électrotechnique, automatique - Lyon. pp 46-49.

**FICKERS. F et al., 2008.** Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Revue de Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **12** (2), 119-130.

**GARIEPY. M.C., 2000.** Etude de mécanisme d'action de l'acétyl-xylane estérase à de *streptomyces lividans*. Mémoire du grade de Maitre de Science en Microbiologie appliquée. INRS-Institut Armand-Frappier. Université du Québec. p 7-8.

**GOBAT. J et al., 2003.** Le sol vivant, base de pédologie, biologie des sols, 2<sup>ème</sup> éd. revue et augmentée (Collection Gérer l'environnement). ISBN: 978-2880745011, p568.

**GOLDBERG. I., MATELES. R.I., 1975.** Growth of *Pseudomonas C* on C1 compounds: enzyme activities in extracts of *Pseudomonas C* cells grown on methanol, formaldehyde, and formate as sole carbon sources. *Journal of bacteriology*, **122** (1), 47-53.

**GOLDBERG. I., MATELES. R.I., 2011.** Production and use of lipases in bioenergy. *SAGE-Hindawi Access to Research*, **17** (10), 1-17.

**GUENDOZ. F., BELIBEL. S., 2014.** Etude du potentiel de production des protéases par des souches mycéliennes isolées des zones arides. Mémoire de Master en Microbiologie. Université Constantine I. pp 1-5.

**GUIDERA. M et al., 1997.** The biotechnology international. Cartermill Editions, London, ISBN: 1-86067-198-5, p 310.

**HAROUNA. M.A.R; ALKAMA. M., 2014.** Etude de quelques activités enzymatiques des actinomycètes isolé de deux écosystèmes extrêmes dans le sud Algérien. Mémoire de Master en Microbiologie Générale. Université Constantine I. pp 1-5.

**HERCULANO. P.N., 2011.** Isolation of cellulolytic fungi from of castor (*Ricinus communis*). *Journal of Microbiol*, **62** (1), 1416-1422.

**HUPE. J.F., 2008.** Enrichissement et recherche de certaines activités enzymatiques produites par des bactéries aérobies thermophile. Mémoire du grade de Maitre de Science en Microbiologie appliquée. INRS-Institut Armand-Frappier. Université du Québec. p 6.

**JANG. H.D., CHANG. K.H., 2005.** Thermostable cellulases from *Streptomyces* sp.: scale-up production in a 50-l fermenter. *Journal of Biotechnology Letters*. **27** (1), 239–242.

**JEFFREY. L.S.H., AZRIZAL. M.R., 2007.** Screening for cellulase activities in actinomycetes isolated from different locations of Peninsular Malaysia. *Journal of tropical agriculture and food science( JTAFS)*. **35** (1), 153–157.

**KARAN. R et al., 2012.** Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Journal of biomed central*, **8** (4), 153–157.

**KERMICHE. M., 2013.** Caractérisation de certaines souches microbiennes évoluant dans le blé fermenté et mise en évidence de leurs activités enzymatiques. Mémoire de Magister en Sciences Alimentaires. Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A.). Université Constantine I. p 14.

**KHELIL. O., 2017.** Production de cellulase et d'enzymes associées par des souches de: Le rôle des prétraitements et l'effet des polyphénols, des flavonoïdes et des biosurfactants. Thèse de doctorat en Biotechnologie Végétale. Université Mohamed Boudiaf - Oran, p 14.

**KOHLI. P., GUPTA. R., 2016.** Medical aspects of estérases. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, **8** (8), 1-6.

**KOLLI. N., ZATOUT. R., 2015.** Production de l'alpha amylase par certaines souches fongiques sur différents substrats. Mémoire de Master en Biotechnologie des mycètes, fermentation et production de substances fongiques. Université Mentouri - Constantine, pp 3-10.

**KULKARNI. S et al., 2013.** Microbial esterases. *Journal of current microbiology and applied sciences*, **2** (7), 135-146.

- LEE. Y et al., 2007.** Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3. *Journal of bioresource technology*, **98** (2), 288-297.
- LEE J.Y., HWANG. B.K., 2002.** Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* **48** (1), 407-417.
- LEILE. D et al., 2005.** Screening, purification and characterization of thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Journal of enzyme and microbial technology*, **37** (6), 648-654.
- LU. W.J et al., 2005.** Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. *Journal of General and Applied Microbiology*, **51** (1), 353–360.
- MAIDOUKIA et al., 2014.** Etude de quelques activités enzymatiques des actinomycètes isolé de deux écosystèmes extrêmes dans le sud Algérien. Mémoire de Master en Microbiologie générale et biologie moléculaire des microorganismes. Université Constantine I. pp 3-15.
- MAKI. M.L et al., 2011.** Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. *Journal of Biochemistry and molecular biology*, **2** (2), 146–154.
- MAZZUCOTELLI. C.A et al., 2013.** Isolation and characterization of bacterial strains with a hydrolytic profile with potential use in bioconversion of agroindustrial by-products and waste. *Journal of food science and technology*, **33** (2), 295–303.
- MEKDOUR. Z., HARAOU. S., 2017.** Isolement et identification de certaines bactéries productrices de protéase provenant de plumes de poulet. Mémoire de Master en Génétique moléculaire et génétique des microorganismes. Université Abdelhamid Ibn Badis - Mostaganem. p 9.
- MERABTI. R., 2006.** Isolement et caractérisation de souches levurienne amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Mémoire de Magister en biochimie et microbiologie appliquées. Université Mentouri-Constantine. p26.
- MEZAACHE. S., 2012.** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse de doctorat en Microbiologie. Université Ferhat Abbas - Sétif, pp 1-16.
- MINOTTO. E et al., 2014.** Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. *Journal of Advanced Scientific Research*, **5** (2), 16–23.
- MORGAIN. B., 2015.** Identification et caractérisation des *Pseudomonas* associées à la bactériose de l'abricotier en vallée du Rhône. Mémoire de stage de Master 2: Productions Végétales et Industries Agroalimentaires (PVIA). Entreprise: INRA centre de Recherche PACA. Université de Picardie Jules Verne, pp 10, 11.

**NARAYAN. V.N et al., 2008.** Isolation and characterization of aerobic thermophilic bacteria from the Savusavu Hot Springs in Fiji. *Journal of microbes and environments*, **23** (4), 350–352.

**NINGTHOUJAM. D.S et al., 2009.** Screening, identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkalithermotolerant indigenous actinomycetes. *Journal of World Applied Sciences*, **7** (7), 907-916.

**OBI. S.K.C., ODIBO. F.J.C., 1984.** Partial purification and characterization of a Thermostable actinomycete 3-Amylase. *Journal of applied and environmental microbiology*, **47** (1), 571-575.

**OTAJEVWO. F.D., ALUYI. H.S.A., 2011.** Cultural conditions necessary for optimal cellulase yield by cellulolytic bacterial organisms as they relate to residual sugars released in broth medium. *Journal of Canadian Center of Science and Education*, **5** (3), 141-151.

**OUAGLAL. S., YOUS. M., 2017.** Optimisation par la méthodologie de surface de réponse de l'activité enzymatique à partir des épluchures de pomme de terre. Mémoire de Master en Biotechnologie microbienne. Université Abderrahmane MIRA - Bejaia. p 7.

**OUALI. S., TIDJET. S., 2012.** Production de cellulases par *Bjerkandera* sp et *Trechoderma reesei* par fermentation en milieu solide. Mémoire de stage pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Génie biologique. Université Abderrahmane MIRA - Bejaia. p 13.

**PETIT. J., JOBIN. P., 2005.** La fertilisation organique des cultures Les bases. Fédération d'agriculture biologique du Québec, bibliothèque national de Canada. ISBN: 2-9809006-0-5, p 48.

**POCHON. J., TCHAN. Y.T., 1948.** Précis de microbiologie du sol. Edition Masson. Lyon - France (Collection Monographies de l'Institut Pasteur, N°7), p 140.

**RABHI N.H., 2011.** Isolement de *Pseudomonas* spp. fluorescents d'un sol salé. Effet d'osmoprotecteurs naturels. Mémoire de Magistère en Génie microbiologique. Département de Microbiologie. Université Ferhat Abbas - Sétif, pp 3-18.

**RAVAL. K.M et al., 2012.** Biotransformation of a single amino-acid L-tyrosine into a bioactive molecule L-DOPA. *Journal of Scientific and Research Publications*, **2** (5), 250-315.

**REFFAS. F.Z.I, 2017.** Isolement et caractérisation de bactéries productrices de cellulase. Thèse de doctorat en Microbiologie moléculaire et proteomics. Université Djilali Liabes - Sid Bel Abbes, pp 33-37.

**ROGER. P., GARCIA J.L., 2001.** Introduction à la microbiologie du sol. Marseille, Université de Provence. p 193.

**SHARMA. R et al., 2001.** Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Journal of Biotechnology Advances*, **19** (8), 627-662.

**SHUKLA. G., VARMA. A., 2010.** Role of enzymes in maintaining soil health. In: Soil enzymology. 1<sup>ère</sup> Édition Illustrée, London (Collection Springer-Verlag Berlin Heidelberg). ISBN: 9783642142253, pp 119-149.

**SIERRA. G., 1957.** a simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Journal of Microbial Seriol*, **23** (1), 15-22.

**SINE. J.P., 2010.** Enzymologie et applications. Ellipses Edition Marketing S.A. Paris Cedex 15. (Collection Parcours LMD, N°. 6) ISBN: 978-2-7298-5324-2. pp 9-26.

**SUZUKI. S.I et al., 1999.** Selective isolation and distribution of *Sporichthya* strains in soil. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, **65** (5), 1930-1935.

**TABBASSUM. K et al., 2015.** Industrially important hydrolytic enzyme diversity explored in stove ash bacterial isolates. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, **28** (6), 2035-2040.

**VERMA. M et al., 2007.** Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Journal of biochemical engineering* , **37** (1), 1-20.

**VIOLLET. A., 2010.** Influence du système de sécrétion de type III bactérien dans les interactions plante-*Pseudomonas* spp. fluorescents non pathogène. Mémoire du grade de Docteur en Ecologie microbienne. Université de Bourgogne - France. p 15.

**WHIPPS. J.M., 2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental botany*, **52** (1), 487-511.

**WHITE. R.E., 2006.** Principles and practice of soil science. the soil as a natural resource. *Blackwell Publishing*, **42** (3), 367-373.

# **Annexes**

# Annexes

## Annexe (01)

**Tableau I:** représente le matériel utilisé dans cette étude.

<b>Matériel</b>	<b>Marques</b>	<b>Origines</b>
<b>Hotte microbiologique</b>	<b>STERIL-GEMINI</b>	<b>Italy</b>
Autoclave	OPTIKA B-350	Italy
Distillateur	Inolab pH 730	Switzer land
Bain marie	Memmert type UNB400	Germany
Etuves a 29° C	J.P.SELECTA,s ,a	Germany
Réfrigérateur / congélateur	BuchI Distillation Unit K - 350	Algeria
Compteur de colonies		Spain
Balance de précision	SANOCLAV LaM-3-20- ECZ-J	Italy
Balance électrique	KERN ALS 220-4N	Germany
Plaque chauffante	AGIMATRICE-E	Algeria
Ph mètre	Memmert	Germany
Vortex	Scientific	/
Bec bunsen	Fisher Scientific FB 15024 INTEGRA Biosciences®, model FIREBOY eco, bec Bunsen	/
Micropipette	SCI LOGEX	/

# Annexes

---



**Autoclave**



**Distillateur**



**Vortex**



**Etuves a 29° C**



**Balance électrique**



**Compteur de colonies**



**Bain marie**



**Plaque chauffante**



**Micropipette**

# Annexes

---

## Annexe (02)

### I. Milieux de culture pour l'isolement

#### 1) Milieu de culture liquide (g/l)

- **Bouillon nutritif (BN)**

✓ Peptone .....	10g
✓ Extrait de viande .....	5g
✓ Na Cl .....	5g
✓ Eau distillée .....	1 L

pH = 7.2

#### 2) Milieux de culture solides (g/l)

- **PCA (Plate Count Agar)**

✓ Caséine.....	05g
✓ Extrait de levure .....	2.5g
✓ Glucose.....	01g
✓ Agar .....	15g
✓ Eau distillée.....	1L

pH= 7

- **GN (Gélose Nutritif)**

✓ Peptone .....	15g
✓ Extrait de viande .....	10g
✓ Extrait de levure .....	02g
✓ Chlorure de sodium.....	05g
✓ Agar .....	20g
✓ Eau distillée.....	1L

pH= (6.7 - 7.4)

- **King A**

✓ Peptone .....	20 g
✓ Glycérol .....	10 g

## Annexes

---

✓ Sulfate de potassium .....	10 g
✓ Chlorure de magnésium .....	1.4 g
✓ Agar .....	12 g
✓ Eau distillée .....	1L

pH= 7.2

### • King B

✓ Peptone.....	20g
✓ Glycérol.....	10g
✓ Phosphate dipotassique .....	1.5g
✓ Sulfate de magnésium, 7H <sub>2</sub> O .....	1.5g
✓ Agar .....	15g
✓ Eau distillée.....	1l

pH= 7.2

## II. Milieux pour les tests enzymatiques

### • La gélosé au 10% lait écrémé

✓ Extrait de levures.....	2.5g
✓ Glucose .....	1g
✓ Agar.....	15g
✓ Eau distillée.....	1l

pH= 7

### • La gélose à la CMC

✓ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	6g
✓ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	3g
✓ NaCl.....	0.5g
✓ NH <sub>4</sub> Cl.....	1g
✓ Extrait de levure .....	3g
✓ CMC.....	5g
✓ Agar.....	15g
✓ Eau distillée.....	1L

pH= 7

# Annexes

---

- **l'activité amylasique**

✓ KNO <sub>3</sub> .....	0.5g
✓ K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.0g
✓ MgSO <sub>4</sub> .....	0.2g
✓ CaCl <sub>2</sub> .....	0.1g
✓ FeCl <sub>3</sub> .....	0.001g
✓ Amidon soluble.....	10g
✓ agar.....	15g
✓ Eau distillée.....	1L

pH=7,2

- **Le milieu de Sierra additionné de tween 80**

✓ Peptone .....	10g
✓ NaCl .....	5g
✓ CaCl 2H <sub>2</sub> O.....	0.1g
✓ Agar.....	18 g
✓ Eau distillée.....	1L

pH= 7.4

- **Le milieu de Sierra additionné de tween 80**

✓ Peptone .....	10g
✓ NaCl .....	5g
✓ CaCl 2H <sub>2</sub> O.....	0.1g
✓ Agar.....	18 g
✓ Eau distillée.....	1L

pH= 7.4

### III. Colorant

- **Lugol**

✓ Iode.....	5g
✓ Iodure de potassium .....	10 g
✓ Eau distillée.....	100 ml

## Annexes

---

- **Eau physiologie**

- ✓ Chlorure de sodium (Na cl) ..... 9g
- ✓ Eau distillée ..... 1L

# Annexes

## Annexe (03)



(1) la couche superficielle du sol sont écartés



(2) 50 à 100 du sol est prélever



(3) introduit le sol dans un sachet en plastique stérile



(4) le sol a étudié



(5) le sol mis dans une glacière (4°C)



(6) l'échantillon doit être directement transportés au laboratoire

**Figure 05: Les étapes de prélèvement des échantillons**

تطرق عملنا إلى دراسة البكتيريا المعزولة من التربة الغنية بالمادة العضوية المتحللة والتي أخذت من منطقتي (القليعة، غيلاسة) من ولاية برج بوعريبيج خلال شهر ماي 2019. حيث تم التركيز على إظهار قدرتهم على إنتاج بعض الإنزيمات (البروتياز، السليلوز، الأميلاز، الاستراز والليباز). 110 عزلة مختلفة عزلت: 66 عزلة من تربة 1 و 44 عزلة من تربة 2 ومنهما تم عزل *Pseudomonas spp* 40. وقد أظهرت نتائجنا أن 103 عزلة لديها نشاط إنزيمي على الأقل، مما يوضح أهمية هذه الأخيرة. 07 عزلات لا يمكنها إنتاج إنزيم (عزلات غير نشطة). الكازيناس هو الإنزيم الأكثر إنتاجا الذي أنتجته العزلات (80 %)، يليه كاربوكسيميثيل سيلولاز (73.63 %) والليباز (35.45%) حيث يعد كل من الأميلاز و Tween 80 الأقل تفككا من بين جميع مواد التفاعل بنسبة 0.91%. من بين هذه العزلات عرضت 5 عزلات أفضل المؤشرات الانزيمية ( E-2-22, E-2-21, E-1-41, P-1-10 و E-2-24) والتي تتمثل في (الكازيناس, كاربوكسيميثيل سيلولاز, الأميلاز, الاستراز والليباز).

**الكلمات المفتاحية:** *Pseudomonas spp.*, نشاط إنزيمي, كاربوكسيميثيل سيلولاز, مؤشر إنزيمي, عزلة.

## Résumé

Notre travail s'est intéressé à l'étude des bactéries isolées à partir du sol riche en matière organique en décomposition. Prélevée de deux régions (Goléa, Ghailasa) de la wilaya de Bordj Bou Arreridj pendant le mois de Mai 2019, et a porté sur la mise en évidence de leur aptitude à produire quelques enzymes (protéase, cellulase, amylase, estérase, et lipase). 110 colonies différentes sont isolées et purifiées: 66 à partir du sol 1 et 40 à partir du sol 2 dont 40 isolats sont des *Pseudomonas spp.*. Nos résultats ont démontré que 103 souches ont montré au moins une activité enzymatique, ce qui démontre leur importance avec 07 Isolats n'a pu produire d'enzyme (des isolats non active). La caséinase est l'enzyme la plus produite par nos souches (80 %), suivie par la carboxymethylcellulase (CMCase) (73.63 %) puis la lipase (35.45 %); L'amylase et le Tween 80 sont les substrats les moins dégradés de tous les substrats avec un pourcentage de 0.91%. Cinq isolats (E-2-22, E-2-21, E-1-41, P-1-10 et E-2-24) ont démontré les meilleurs indices enzymatiques, elles sont considérées comme productrices des enzymes (la caséinase, la carboxyméthylcellulase, l'amylase, l'estérase et la lipase).

**Mots clés:** *Pseudomonas spp.*, activité enzymatique, carboxymethylcellulase, isolat, indices enzymatiques.

## Abstract

Our work has focused on the study of bacteria isolated from soil rich in decomposing organic matter. Taken from two regions (Goléa, Ghailasa) of the Bou Arreridj bordj wilaya during May 2019, and focused on demonstrating their ability to produce some enzymes (protease, cellulase, amylase, esterase and lipase). 110 different colonies are isolated and purified: 66 from soil 1 and 40 from soil 2 of which 44 isolates are *Pseudomonas spp.*. Our results have shown that 103 strains showed at least one enzyme activity, demonstrating their importance with 07 Isolates could not produce an enzyme (non-active isolates). Caseinase is the most common enzyme produced by our strains (80%), followed by carboxymethylcellulase (Cmcase) (73.63%) and lipase (35.45%). Amylase and Tween 80 are the least degraded substrates of all substrates with a percentage of 0.91%. Five isolates demonstrated the best enzymatic indices: (E-2-22, E-2-21, E-1-41, P-1-10 and E-2-24) (caseinase, carboxymethylcellulase, amylase, esterase and lipase).

**Key words:** *Pseudomonas spp.*, enzyme activity, carboxymethylcellulase, enzymatic indices, isolates.