



République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi -B.B.A-

كلية علوم الطبيعة و الحياة و علوم الأرض و الكون

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

**Isolement et criblage de microorganismes à
activité enzymatique**

Présenté par :

- KHOUALFIA Karima

-BENSEGHIR Khadidja

Devant le jury :

Président : M^rSADRATI Nouari

MCA Univ Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A

Encadrant : M^{me}SOUAGUI Yasmina

MCB Univ Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A

Examineur : M^{me}ABED Hanane

MCA Univ Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A

Année universitaire : 2023-2024

REMERCIEMENT

Avant toute chose, on remercie Dieu, le tout puissant pour nous avoir donnée la force et la patience et la volonté d'entamer et de terminer ce travail modeste

On remercie, en premier lieu, notre encadreur Mme Souagui Yasmina qui a proposé le thème de ce mémoire, et qui a bien dirigé ce travail, avec ses conseils tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

Nos remerciements aux membres de jury :

Mr Sadrati Nouari de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Mme Abed Hanen de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Nos remerciements à Mme Gahfif Ouahiba et Mme Dehamna Wassima d'avoir facilité le travail au laboratoire de Microbiologie de l'université Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A

Sans oublier de remercier tous ceux qui nous ont aidés d'achever ce modeste travail soit de près ou de loin

Dédicace

Je dédie cette mémoire à

La femme la plus chère au monde, ma mère

Mes frères et ma sœur

L'âme sœur Khadîdja, Mes amis à l'université

Karima

DEDICACE

A DIEU, pour m'avoir donné la force dans les moments difficiles d'éditer ce travail.

Je dédie ce travail

A mon cher père AbdElouahab et ma chère mère

Mais aucune dédicace ne serait témoin de mon profond amour, mon immense gratitude et mon plus grand respect, car je ne pourrais jamais oublier la tendresse et l'amour dévoué par lesquels ils m'ont toujours entouré depuis mon enfance.

A l'homme qui me redonne confiance en moi et me soutient, Mon cher mari Mohammed

A mes sœurs et mes frères ainsi que leurs femmes de m'avoir compris et soutenus dans mes moments difficiles et leurs enfants, source de joie et de bonheur

A tous mes amis et machère binôme khoualfia karima

A tous mes professeurs et à toutes les personnes qui m'ont aidée et soutenue de près ou de loin

Tous ceux qui m'aiment et que j'aime

Khadija

Table des matières

Résumé	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
I. Introduction	01
II. Matériel et Méthodes	06
II.1. Prélèvement des échantillons du sol	06
II.2. Isolement et purification des souches bactériennes	07
II.2.1. Préparation de la solution mère	07
II.2.2. Préparation des dilutions	07
II.2.3. Isolement et purification	07
II.3. Identification des microorganismes sélectionnés	08
II.3.1. Identification des isolats bactériens	08
II.3.2. Identification des isolats fongiques	09
II.4. La mise en évidence des activités enzymatiques	09
II.4.1. La recherche de l'activité protéolytique	09
II.4.2. La recherche de l'activité amylolytique	10
II.4.3. La recherche de l'activité cellulolytique	10
II.5. Effet des paramètres physicochimiques sur l'activité enzymatique	10
II.5.1. Effet de la température sur l'activité enzymatique	10
II.5.2. Effet du pH sur l'activité enzymatique	10
II.5.3. Effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique	10
III. Résultats et discussion	11
III.1. Résultats de l'isolement et de la purification des isolats	11
III.2. Identification des microorganismes sélectionnés	11
III.2.1. Identification des isolats bactériens	11
III.2.2. Identification des isolats fongiques	15
III.3. La mise en évidence des activités enzymatiques	19
III.4. Effet des paramètres physicochimiques sur l'activité enzymatique	24
III.4.1. Effet de la température sur l'activité enzymatique	24
III.4.2. Effet du pH sur l'activité enzymatique	28

III.4.3. Effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique	31
IV. Conclusion	36
Références bibliographiques	
Annexes	

الملخص

في إطار البحث عن الإنزيمات التي تنتجها الكائنات الحية الدقيقة, تم إجراء عزل من التربة الغابية من منطقتين (بومرقد، زمورة) بولاية برج بوعرييج. بعد عزل و تنقية وتحديد الكائنات الحية الدقيقة المختارة حصلنا على أربع عزلات فطرية من جنسين (02 *Aspergillus* و *Penicillium*) و عشر عزلات بكتيرية. إن التحديد الذي تم إجراؤه للعزلات البكتيرية جعل من الممكن تحديد خصائصها المورفولوجية والبيوكيميائية والفسولوجية. تم تسليط الضوء على النشاط الإنزيمي المدروس (الاميلاز, السيلولاز والبروتياز) للعزلات الفطرية والبكتيرية على أوساط محددة, ثم دراسة تأثير العوامل الفيزيائية والكيميائية وهي درجة الحموضة (5 و9), درجة الحرارة (40° مئوية, 37° مئوية و 28° مئوية) بالإضافة إلى تركيز الركيزة (3% و 5%) على الأنشطة الإنزيمية السابقة.

أظهرت العزلات الفطرية والبكتيرية نشاطا إنزيميا جيدا جدا. بحيث أن أفضل نشاط إنزيمي لوحظ عند درجة الحموضة 7 و9, عند درجة حرارة 37° مئوية وعند تركيز الركيزة 1% للإنزيمات الفطرية, أما عند الإنزيمات البكتيرية فلوحظ عند درجة الحموضة 7, درجة الحرارة 28° مئوية وتركيز الركيزة 1%.

الكلمات المفتاحية: النشاط الأنزيمي, البكتيريا, السيلولاز, الفطريات, عزل.

Résumé

Dans le cadre de la recherche d'enzymes produites par des micro-organismes, un isolement a été réalisé à partir de sols forestiers de deux régions (Boummeged et Zammoura) de la wilaya de Bordj Bou Arreridj. Après l'isolement, la purification et l'identification des microorganismes sélectionnés, nous avons obtenus quatre isolats fongiques à savoir deux genres (02 *Aspergillus* et 02 *Penicillium*) et dix isolats bactériens. L'identification réalisée pour les isolats bactériens a permis de déterminer les caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques de ces derniers. Les activités enzymatiques étudiées (amylase, cellulase et protéase) ont été mise en évidence pour les isolats fongiques et bactériens sur milieux spécifiques, puis l'étude de l'effet des facteurs physiques et chimiques à savoir le pH (5 et 9), T° (40°C, 37°C et 28°C) ainsi que la concentration du substrat (3% et 5%), sur les activités enzymatiques précédentes a été réalisée.

Les isolats fongiques et bactériens ont montré une très bonne activité enzymatique. les résultats ont montré que la meilleure activité enzymatique a été observée à pH=7 et 9, à une température de 37°C et à une concentration du substrat de 1% pour les enzymes fongiques, et à pH 7, 28°C et une concentration de 1% de substrat pour les enzymes bactériennes.

Mots clés : Activité enzymatique, Bactéries, Cellulase, Champignons, Isolement.

Abstract

In the context of the research of enzymes produced by microorganisms, isolation was carried out from forest soil of two regions (Boummeged and Zammoura) at Bordj Bou Arreridj city. After the isolation, purification and identification of the selected microorganisms we obtained four fungal isolates representing 2 genus (02 *Aspergillus* and 02 *Penicillium*) and ten bacterial isolates. The identification carried out for the bacterial isolates allowed to determine the morphological, biochemical and physiological characteristics of these isolates. The enzymatic activities (amylase, cellulase and protease) were carried out for the fungal and bacterial isolates on a specific medium for each enzymatic activity; and then the study the effect of physical and chemical factors pH (5, 9), temperature (40°C, 37°C, 28°C) and substrate concentration (3% and 5%) on the previous enzymatic activities. The fungal and bacterial isolates showed well enzymatic activities. The best enzymatic activity for fungal enzymes was at pH = 9 and pH = 7; at temperature of 37°C and 1% of substrate concentration. And best activities for the bacterial enzymes at pH = 7, temperature of 28°C and substrate concentration of 1%.

Key words: Bacteria, Cellulase, Enzymatic activity, Fungi, Isolation.

Liste des Tableaux

Tableau I : Origine des échantillons du sol et leurs aspects.	08
Tableau II : Les isolats fongiques et bactériens obtenus.	11
Tableau III : Etude macroscopique des isolats bactériens isolés à partir des trois échantillons de sol (EA, EB, EC).	11
Tableau IV : Identification microscopique des isolats bactériens.	13
Tableau V : Observation macroscopique des isolats fongiques sur milieu Sabouraud.	16
Tableau VI : Caractéristiques microscopique des isolats fongiques.	17
Tableau VII : Résultats de la mise en évidence des trois activités enzymatiques des isolats bactériens.	19
Tableau VIII : Résultats de la mise en évidence des trois activités enzymatiques des isolats fongiques.	22
Tableau IX : Résultats d'effet de la température sur l'activité enzymatique.	24
Tableau X : Résultats de l'effet du pH sur l'activité enzymatique à différents pH.	28
Tableau XI : Résultats de l'effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique.	32

Liste des figures

Figure 01 : Site de collecte de l'échantillon du sol A (à gauche) dans la région de Boumergued et sol B et C (à droite) dans la région de Zemmoura.	06
Figure 02 : Résultat du test catalase des isolats bactériens	15
Figure 03 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats bactériens	21
Figure 04 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats fongiques.	23
Figure 05 :Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats bactériens à température 28 C°.	26
Figure 06 :Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats bactériens à température 40 C°.	26
Figure 07 :Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats fongiques à température 37 C°.	27
Figure 08 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats fongiques à température 40 C°.	27
Figure 09 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats bactériens à pH=5.	29
Figure 10 :Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats bactériens à pH=9.	30
Figure 11 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats fongiques à pH=5.	30
Figure 12 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats fongiques à pH=9.	31
Figure 13 :Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats bactériens à concentration de substrat de 3%.	33
Figure 14 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats bactériens à concentration de substrat de 5%	33
Figure 15 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats fongiques à concentration de substrat de 3%.	34
Figure 16 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats fongiques à concentration de substrat de 5%.	34

Liste des abréviations

CMC : Carboxyméthylcellulose

EC : Enzyme commission

g : Gramme

GN : Gélose nutritive

h : Heur

HCl : Acide chlorhydrique

ml : Millilitre

mm : Millimètre

Na Cl : Chlorure de sodium

pH : Potentiel d'hydrogène

µl : Microlitre

% : Pourcentage

Introduction

I. Introduction

Les réactions métaboliques impliquant les enzymes permettent aux différentes cellules d'effectuer les fonctions pour lesquelles elles existent et cela s'applique parfaitement bien aux bactéries et aux champignons. En effet, certains organismes à l'aide d'enzymes, peuvent dégrader des composés se trouvant dans leur environnement, et ce caractère peut être utilisé par certaines industries de différents domaines (**Chenel, 2005**).

Les enzymes fongiques ou bactériennes peuvent être utilisées de plusieurs manières afin d'atteindre des buts souvent très différents les uns des autres. Elles sont utilisées dans l'industrie des pâtes et papiers, dans les textiles, dans les détergents, dans les tanneries, dans l'industrie alimentaire, dans celle des alcools, dans les boulangeries, dans les confiseries, dans l'industrie laitière ainsi que pharmaceutique. Il est alors possible de développer de grands marchés mondiaux de production d'enzymes. En 1998, le marché mondial des enzymes générait environ 1.5 milliard de dollars et les prédictions prévoyaient des augmentations de 2% à 25% de ce chiffre annuellement, dépendant du domaine (**van Behen et Li, 2002**). Ce marché est en voie d'expansion et remplacera bientôt celui des produits chimiques qui sont, bien souvent, très polluants.

La demande mondiale au niveau industriel pour les enzymes d'origine microbienne croît d'une année à l'autre, et ce afin d'améliorer certains procédés de fabrications tels que l'industrie du textile (décoloration de jeans par exemple), la papeterie (procédé de blanchiment de la pâte à papier), la dépollution (attaque des substances phénoliques...), l'industrie alimentaire (boulangerie...) (**Dvail et al., 2010**).

Pour faire face à la demande croissante des industriels notamment dans le domaine des biocatalyses et en se basant sur le modèle de la synthèse organique « traditionnelle » pour aboutir à une chimie « verte » plus respectueuse de l'environnement, de nombreux efforts ont été fournis pour la recherche d'enzymes d'intérêt industriel. Une attention particulière pour les enzymes provenant de microorganismes a fait l'objet de plusieurs études (**Dvail et al., 2010**).

En effet, les microorganismes ont développé des stratégies très variées pour s'adapter aux contraintes physico-chimiques auxquelles ils font face (température, pression, salinité et pH). Les enzymes qui participent à ces stratégies seront sans doute d'un grand intérêt

pour intervenir dans les procédés industriels surement travaillant en conditions de haute température ou de grande salinité (**Gregoire et al., 2009**).

Les enzymes sont des macromolécules protéiques de haute masse moléculaire (de 10 à 1000 kilo daltons), qui catalysent les réactions chimiques en augmentant leurs vitesses d'au moins 10⁶ fois, par rapport à la réaction en leur absence (**Granner, 2008**). Les enzymes, ou catalyseurs, existent dans les êtres vivants afin de faciliter les réactions qui se déroulent dans les cellules. Comparées aux catalyseurs chimiques, les enzymes sont capables d'amener plus rapidement une réaction à sa position d'équilibre (**Sine, 2010**).

Les enzymes se retrouvent chez tous les organismes vivants incluant les bactéries, les champignons, les animaux, les végétaux et l'homme. Par conséquent, les microorganismes restent la source alternative la plus exploitée (**Nigam, 2013**).

Les premières enzymes microbiennes ont été découvertes au cours du 20^{ème} siècle et depuis, leurs techniques d'isolement, de caractérisation, de production dans différents types de bioréacteurs ainsi que leurs applications en bioindustrie ont évoluées. Les caractéristiques spécifiques de ces enzymes représentent leurs activités dans des conditions défavorables de culture, particulièrement, celles relatives à la température et au pH (**Nigam, 2013**).

Parmi les enzymes les plus importantes dans industrie, on trouve la cellulase. La cellulase, formant un système enzymatique complexe se rapporte à un groupe d'enzymes qui agissant ensemble, hydrolysent la cellulose en sucres simples (**Kader et al., 1999 ; Korish, 2003**). Elle est l'une des principaux membres de la famille des glycosides hydrolases. C'est un système enzymatique complexe, composé de trois types principaux : l'endo β (1-4)-glucanase ou endocellulase (EC 3.2.1.4), intervient dans la réaction par des lésions aléatoires des polymères du glucose et donne suite à de petites portions fibrillaires de différentes longueurs, avec ou sans extrémités réductrices ; exo β (1-4) glucanase ou celloiohydrolase (EC 3.2.1.91), elle attaque les extrémités cristallines à réduction libre (produit précédent) pour avoir la cellobiose (diholoside) et la β (1-4)-glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21) permet de libérer le glucose comme produit final en séparant les disaccharides (**Xu, 2002**).

Les cellulases peuvent être produites par les champignons : *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* et *Piromonas commmunis* et les levures : *Khryveromyces lactis* (**Hasper et al., 2002**). Parmi les bactéries cellulolytiques :

Sporocytophaga, *Myxococcoides*, *Baccillus subtilis*, *Cellulomonas* et *Pseudomonas*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium stercorarium*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefasciens* et *Bactéroides succinogenes*(**Vidaud,1984**) et *Erwinia chrysantharum* qui possèdent un seul complexe multienzymatique extracellulaire appelé cellulosome(**Schwarz, 2001**). Des actinobactéries tels que *Thermomonospora fusca*(**Tuncer et al., 1999**), quelques archaebactéries *Pyrococcus orikoshii*(**Ando et al., 2002**).

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

Les protéases appelées aussi protéinases ou enzymes protéolytiques, font partie de la famille des hydrolases. Ce sont des enzymes dont la fonction est l'hydrolyse des liaisons peptidiques au niveau des protéines, générant de petits peptides et acides aminés (**Ram et al., 2019**).

Les enzymes protéolytiques sont subdivisées en deux groupes (**Gupta et al.,2002 ; Ram et al., 2019**), les **exopeptidases** : ce sont des aminopeptidases et des carboxypeptidases qui interviennent dans le clivage des liaisons peptidiques qui forment les groupements amines et carboxyles des protéines présentes dans le milieu extracellulaire. **Les endopeptidases** : interviennent dans divers processus métaboliques et cellulaires telles que la sporulation et la maturation des enzymes et/ou des hormones en coupant les liaisons peptidiques internes du substrat. Les protéases microbiennes représentent environ 40% du total des ventes mondiales d'enzymes et sont en général de nature extracellulaire.

Les microorganismes représentent une source intéressante de protéases car ils peuvent être cultivés en grandes quantités en un temps relativement court par des procédés de fermentation établis produisant un approvisionnement régulier et abondant du produit souhaité. En outre, ils peuvent être manipulés génétiquement pour générer de nouvelles

enzymes (**Bhunia et al.,2014**). Elles peuvent être produites par les bactéries, les champignons, les levures (**El enshasyetal., 2008**) et les virus (**Joo et al., 2007**). Ces protéases sont de plus en plus utilisées à cause de leur importance et de leurs applications dans l'industrie et la biotechnologie (**Krishna et al.,2009**).

Parmi les bactéries, les espèces de *Bacillus* sont les producteurs spécifiques de protéases extracellulaires (**Das et Prasad, 2010**). Un nombre important d'espèces d'*Aspergillus* sont connus pour leurs productions des protéases extracellulaires (**Siala et al., 2009**). Certaines levures peuvent également produire protéase : *Aureobasidium pullulans*(**Chi et al., 2007**).

Les protéases constituent l'un des groupes les plus importants d'enzymes industrielles et académiques, représentant environ 65 % du marché annuel des enzymes. Elles ont des applications dans les industries alimentaires et des détergents où les protéases alcalines détiennent la plus grande part du marché mondial des enzymes. En raison de leurs applications répandues, de nombreuses industries ont commencé la production au niveau commercial.

Les amylases représentent 56 % du marché des enzymes dans le monde (**Van der Maorel et al.,2002**). L'alpha amylase hydrolyse de façon aléatoire les liaisons alpha (1-4) et conduit à la formation d'oligosaccharides linaires et dextrans (**Janecek, 1994**). L'alpha amylase est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires de type endoglycanase de la classe des hydrolases. En général, il existe plusieurs modes d'actions des α -amylases. Selon les conditions (température, pH, taille et structure du substrat), l'enzyme peut utiliser l'un ou l'autre mode et même une combinaison entre plusieurs modes (**Nielson et al., 2001**).

- ❖ Attaque aléatoire : l' α -amylase hydrolyse aléatoirement les liaisons glucosidiques libérant deux fragments qui seront séparément attaqués.
- ❖ Attaque préférée : l' α -amylase montre une préférence pour certaines liaisons dans le substrat.
- ❖ Attaque répétitive ou multiple : elle implique le déplacement de l'enzyme tout au long de la chaîne du substrat, pour hydrolyser les liaisons glucosidiques sans se dissocier du substrat (**Berry, Paterson, 1990**).

La bêta amylase: elle libère surtout du maltose par rupture des liaisons 1-4 : hydrolyse saccharifiant, son action est stoppée au niveau des ramifications (1-6) de l'amylopectine.

L'amylo 1-4 glucuronidase : utilisé dans la fabrication du dextrose : elle libère du glucose (dextrose) par rupture des liaisons (1-4) (**Multon, 1992**).

Les amylases peuvent être obtenues principalement par fermentation de Bacilliacées, historiquement la première enzyme a été produite à partir de souches de *Bacillus amylolique faciens*, *Bacillus licheniformis* ou *Bacillus subtilis*. Cependant d'autres espèces, produisant également cette enzyme telle que *Thermobifida fusca*, *Streptomyces sp.* Certaines levures produisent industriellement de l' α -amylase : *Candida*, *Filobasidium capsuligenum*(**Dakhmouch, 2016**).

Les amylases des espèces fongiques *Aspergillus niger* et *Aspergillus oryzae* sont saccharifiantes et forment une grande quantité de maltose et maltohexose, alors que celles des bactéries (*Bacillus licheniformis* et *Bacillus stearothermophilus*) sont liquéfiantes, produisant un mélange de sucres du glucose jusqu'au maltohexose (**Sicard, 1982**).

Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie (**Gupta et al., 2003**). Les amylases ont des applications potentielles dans un certain nombre de processus industriels tels que dans les industries alimentaires, textiles, papetières, panification, détergents, jus de fruits, boissons alcoolisées, édulcorants, aide digestive et détachant dans le nettoyage à sec...etc. (**Saranraj et Stella, 2013 ; Singh et al., 2011**).

Le présent travail porte sur l'isolement et la sélection de souches (fongiques et bactériennes) productrices d'enzymes à savoir, la cellulase, amylase et protéase.

Matériel et Méthodes

II- Matériel et méthodes

II.1 Prélèvement des échantillons du sol

Dans cette étude deux échantillons (**A**, **B**) de sol ont été collectés dans deux sites différents de la wilaya de Bordj Bou Arreridj à savoir la forêt de Boummergued et Zemmoura (Figure 01).



Figure 01 : Site de collecte de l'échantillon du sol A (à gauche) dans la région de Boummergued et sol B et C (à droite) dans la région de Zemmoura.

Tableau : Origine des échantillons du sol et leurs aspects.

Echantillon	Origine	Type de sol	Aspect
Sol A	Boummergued	Forestier, riche en pins.	
Sol B	Zemmoura	Forestier, riche en chênes.	

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, et sont directement transportés au laboratoire en vue de leurs analyses. Une partie de l'échantillon **B** a subi un chauffage pendant 30 minutes à 40°C (échantillon **C**).

II.2. Isolement et purification des souches bactériennes

II.2.1. Préparation de la solution mère

A partir de chaque échantillon de sol destiné à l'analyse, 10g de sol est pesé puis introduit dans un flacon contenant 90 ml d'eau physiologique stérile. Le flacon est ensuite agité énergiquement pendant 2 minutes. Le contenu représente la solution mère.

II.2.2. Préparation des dilutions

A l'aide d'une micropipette de 1000 µL, une série de dilution (10⁻¹ à 10⁻⁶) doit être préparée en prélevant 1g de sol et en le plaçant dans un tube à essai stérile contenant 9 ml d'eau physiologique pour obtenir la première dilution de 10⁻¹ puis de chaque dilution la même opération est répétée jusqu'à obtention de la dilution 10⁻⁶ (**Abdesselam et Latache, 2017**).

II.2.3. Isolement et purification

Cette étape permet de mettre en évidence la flore microbienne existante dans les trois échantillons de sol. Les bactéries et les champignons sont isolés à partir des dilutions décimales (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶) par ensemencement de 100µl de chacune de ces dilutions en surface sur les deux milieux d'isolement (Sabouraud et GN). Les boîtes ont été ensuite incubées à 28°C pendant 24 à 72h pour le milieu Sabouraud et à 37°C pendant 24h à 48h pour le milieu GN.

Après incubation et développement des différentes souches, des repiquages successifs ont été effectués pour purifier les souches jusqu'à l'obtention de colonies pures dans chaque boîte de Pétri. Le repiquage s'est fait sur les mêmes milieux de départ (Sabouraud pour les champignons et GN pour les bactéries).

Une fois purifié, chaque isolat est désigné par un numéro de code précédé par la lettre (EA pour le premier échantillon, EB pour le deuxième échantillon et EC pour le troisième échantillon). Les isolats ont été conservés au réfrigérateur à 4°C.

II.3. Identification des microorganismes sélectionnés

II.3.1. Identification des isolats bactériens

a) Identification macroscopique

L'identification macroscopique des bactéries a été faite après leur croissance sur milieu GN et leur incubation à 37°C pendant 24h. C'est une description faite sur boîtes d'isolement, permettant une distinction des souches les unes des autres afin de les purifier. Elle permet de déterminer l'aspect macroscopique des colonies (forme, aspect, couleur, contour, taille, etc.) (**Badis et al., 2005**).

b) Identification microscopique

- Etat frais

L'observation microscopique a été effectuée à l'aide d'un microscope optique. Elle a permis l'observation des bactéries à l'état frais et la détermination de leur morphologie, de leur mode de regroupement et de leur mobilité. La méthode consiste à déposer une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile sur la lame, puis apporter et dissocier dans la goutte un prélèvement bactérien de la colonie à observer et l'observation a été faite au grossissement (16x40) (**Singleton, 2005**).

-Coloration de Gram

Sur chacune des lames dont les souches sont fixées, quelques gouttes de violet de gentiane ont été déposées, laisser agir pendant 1min. Après rinçage avec de l'eau de robinet, du Lugol a été redéposé pendant 1min pour le mordantage. Ensuite, la décoloration a été faite par l'alcool à 95° pendant 30secondes puis un autre rinçage a été effectué. Enfin, un deuxième colorant (fuschine) a été déposé pendant 30secondes (**Larpen, 1992**).

Après le dernier lavage et séchage des lames, l'observation a été réalisée au microscope optique (10x100) par l'ajout d'une goutte d'huile à immersion.

-Test de Catalase

Il s'agit de la recherche de la catalase, enzyme responsable de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Son principe consiste à mettre en contact une colonie de l'isolat en présence d'eau oxygénée. Une effervescence due à un dégagement gazeux traduit la présence de cette enzyme (**Joffin et Leyral, 2006 ; Tankeshwar, 2013**).

II.3.2. Identification des isolats fongiques

L'identification des souches fongiques isolées est basée sur les caractères sculpturaux (identification macroscopique) et la morphologie (identification microscopique).

a) Observation macroscopique

Les caractères morphologiques et culturaux ont été déterminés après ensemencement des souches pures sur le milieu Sabouraud, l'identification a été faite à l'œil nu basée essentiellement sur la vitesse de croissance, la texture et couleur du thalle, le mode de sporulation et la couleur du revers de la colonie.

b) Observation microscopique

L'identification microscopique a été effectuée par la méthode du scotch. Un petit morceau de scotch est appliqué par la face collante sur la colonie à l'aide d'une pince puis déposé sur une lame contenant quelques gouttes de Bleu de Méthylène. L'observation microscopique a été réalisée au microscope optique au grossissement 16x40 et 16x100.

L'examen microscopique est basé sur les caractères morphologiques du mycéliens en notant les types de spores, l'aspect du thalle, la couleur et la disposition des spores, conidies (**Mouria et al., 2013**).

II.4. La mise en évidence des activités enzymatiques

Le principe de cette technique consiste à mettre en évidence les zones d'hydrolyse en utilisant des réactifs particuliers. Les enzymes recherchées dans cette étude sont la protéase, l'amylase et la cellulase.

II.4.1. La recherche de l'activité protéolytique

Ce test a été réalisé en cultivant les isolats fongiques et bactériens sur milieu gélosé contenant 1% de lait écrémé(Annexe). L'ensemencement a été fait par spot ou par strie, et l'incubation à 37°C pendant 24h à 48h pour les bactéries et à 28°C pendant 24h à 72h pour les champignons.

La gélose au lait est favorisée en raison de sa préparation facile, sa teneur élevée en protéines et son faible coût (**Smith et al., 1952**).

L'hydrolyse des protéines du lait est indiquée par la présence d'une zone claire autour du spot ou de la strie, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (**Gordonr et al., 1973 ; De Vos et al., 2009**).

II.4.2. La recherche de l'activité amylolytique

Le milieu contenant de l'amidon soluble à 1% (Annexe) a été utilisé pour la sélection des isolats amylolytiques. Le milieu est coulé sur boîtes de Pétri, ensemencé par spot ou par strie puis incubé à 37°C pendant 24h à 48h pour les bactéries et à 28°C pendant 24h à 72h pour les champignons.

Après incubation, les boîtes ont été inondées avec une solution de Lugol. Après quelques minutes de contact, l'excès éliminé et les boîtes lavées à l'eau distillée. L'eau iodée contenant l'iode se complexe avec l'amidon présent dans le milieu et donne un précipité bleu sombre. Si l'amidon est hydrolysé, une zone claire autour de la colonie productrice d'amylase (Tatsinkou et al., 2005).

II.4.3. La recherche de l'activité cellulolytique

Pour la mise en évidence de l'activité cellulolytique un milieu contenant 1% carboxyméthylcellulose (CMC) (Annexe) a été utilisé. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h à 48h pour les bactéries et à 28°C pendant 24h à 72h pour les champignons.

Après incubation, les boîtes ont été inondées avec une solution de Lugol pendant quelques minutes puis lavées à l'eau distillée. Le développement d'un halo clair autour des colonies indique la présence de l'enzyme (Verma et al., 2007).

II.5. Effet des paramètres physico-chimiques sur l'activité enzymatique

II.5.1. Effet de la température sur l'activité enzymatique

Dans ce test le même protocole réalisé précédemment est suivi, mais l'incubation des boîtes a été faite à différentes températures, à savoir : à 28°C et 40°C pour bactéries, et à 37°C et 40°C pour les champignons.

II.5.2. Effet du pH sur l'activité enzymatique

L'effet du pH sur l'activité enzymatique a été déterminé à pH : 5 et 9. En ajoutant des gouttes de solution de NaOH ou HCl pour modifier le pH du milieu gélosé, en conservant toutes les autres conditions (température et la concentration des substrats).

II.5.3. Effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique

L'activité enzymatique a été étudiée à cet effet en fonction de la concentration du substrat 3% et 5% pour chaque substrat (CMC, amidon et caséine du lait). En suivant le même protocole décrit précédemment.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Résultats d'isolement et de la purification des isolats

Les isolats fongiques et bactériens obtenus des trois échantillons du sol sont représentés dans le tableau II ci-après :

Tableau II : Les isolats fongiques et bactériens obtenus.

Echantillons	Isolas bactériens	Isolats fongiques
EA	B2,B8	C4
EB	B10, B9, B13, B11	/
EC	B5, B2, B7, B1	C1, C2, C3

Ces résultats différents probablement selon le sol, le climat des deux régions, et le traitement à la chaleur (40°C) pour l'échantillon EC.

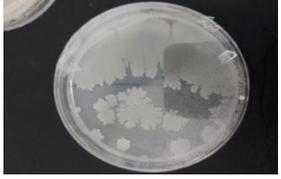
III.2. Identification des microorganismes sélectionnés

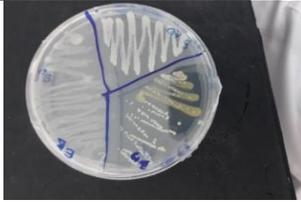
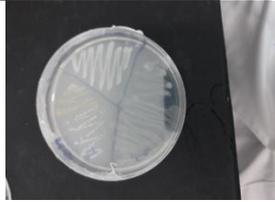
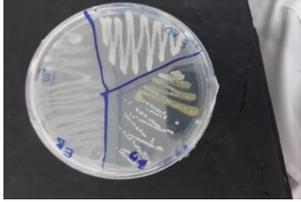
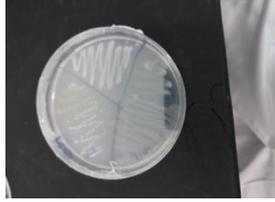
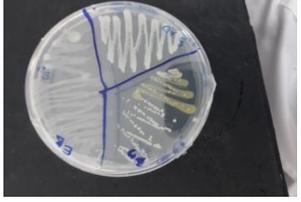
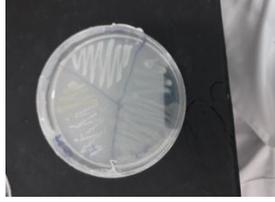
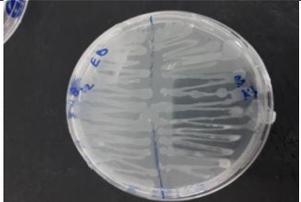
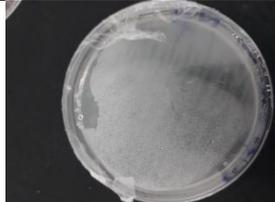
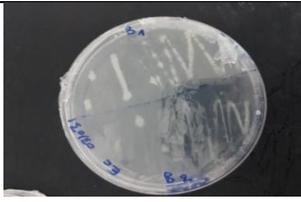
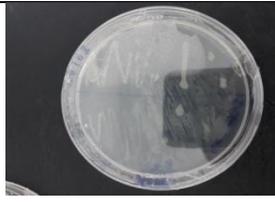
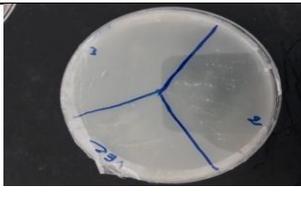
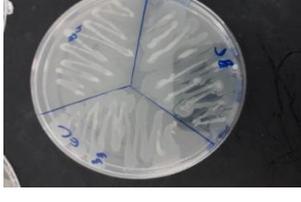
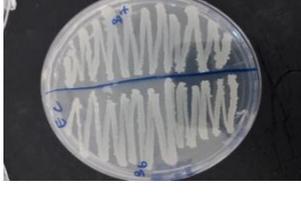
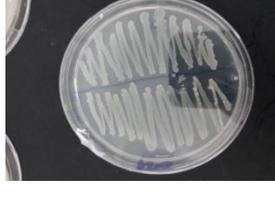
III.2.1 Identification des isolats bactériens

a. Identification macroscopique

L'identification macroscopique des bactéries a été faite après leur croissance sur milieu GN, le tableau III résume l'aspect macroscopique des colonies (forme, aspect, couleur, contour, taille... etc.).

Tableau III : Etude macroscopique des isolats bactériens isolés à partir des trois échantillons de sol (EA, EB, EC).

Code de l'isolat	Surface	Revers de la boîte	Description
B2EA			Grande colonie plate de couleur blanchâtre Et bord irrégulier.
B8EA			Grande colonie, blanche, muqueuse et bombée.

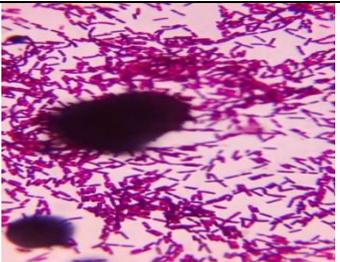
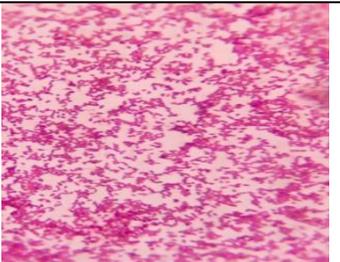
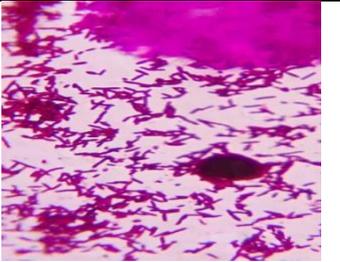
B9EB			Petite colonie, ronde, de couleur jaunâtre.
B10EB			Petite colonie, ronde, bombée, de couleur blanchâtre.
B11EB			Grande colonie plate, transparente et incolore (translucide).
B13EB			Grande colonie plate, transparente et incolore.
B1EC			Grande colonie plate, transparente et incolore à contour irrégulier.
B2EC			Petite colonie ronde et transparente.
B5EC			Grande colonie plate ; muqueuse et blanchâtre.
B7EC			Grande colonie plate ; muqueuse et blanchâtre à bord irrégulier.

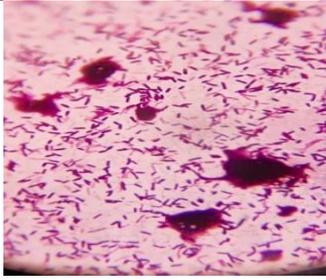
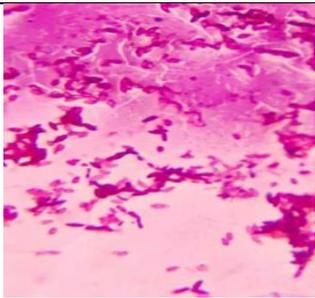
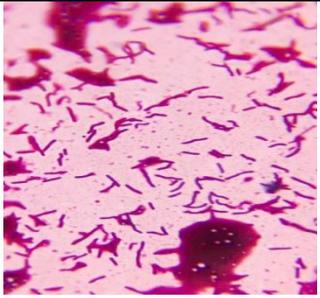
L'observation macroscopique des isolats sur GN a permis de dégager plusieurs aspects différents des colonies. Les isolats ont montré une croissance optimale à la température d'incubation (37°C).

b. identification microscopique

Le tableau IV résume l'aspect microscopique des isolats bactériens, l'état frais (mobilité), coloration de Gram.

Tableau IV : Identification microscopique des isolats bactériens.

Isolat	Etat frais (mobilité)	Coloration de GRAM		
		Image	+/-	Forme
B2EA	Immobile		+	Bacille
B8EA	Immobile		+	Bacille
B9EB	Immobile		-	Coccobacille
B10EB	Mobile		+	Bacille

B11EB	Immobilie		+	Bacille
B13EB	Immobilie		+	Bacille
B1EC	Immobilie		+	Coccobacille
B2EC	Immobilie		+	Bacille
B5EC	Immobilie		-	Coccobacille
B7EC	Immobilie		+	Bacille

La coloration de Grama révéla que 8 souches sont à Gram positif et 2 souches à Gram négatif. Les formes cellulaires observées sous microscope photonique sont des bacilles et coccobacilles. La plupart des souches sont immobiles sauf la souche(B10EB).

c. Test de Catalase

Les résultats du test catalase obtenus sont comme suit : cinq souches catalase positive (B13EB, B11EB, B9EB, B1EC, B5EC) et cinq souches catalase négative (B2EA, B2EC, B7EC, B8EA, B10EB).

Les résultats du test catalase des isolats bactériens sont présentés sur la figure ci-dessous :

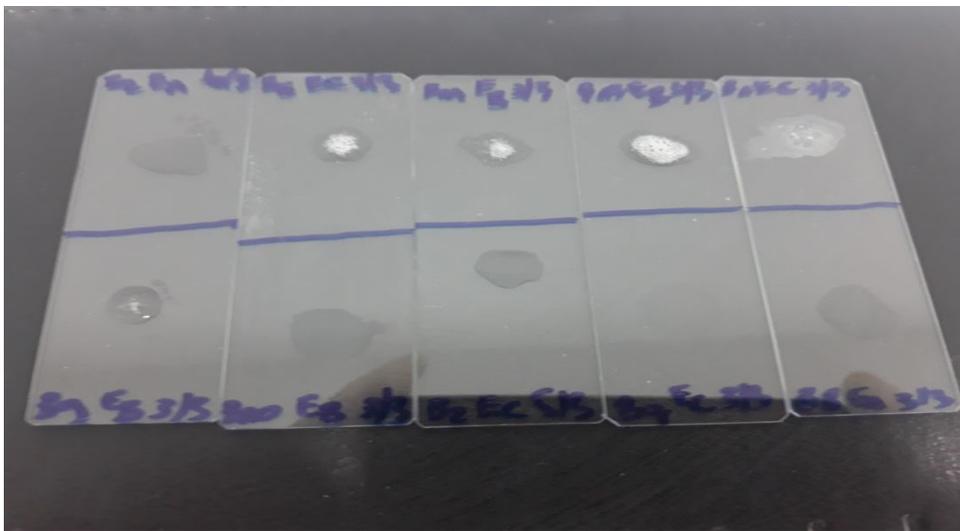


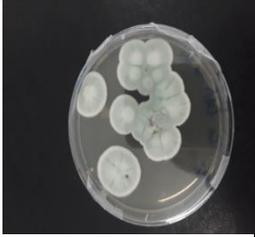
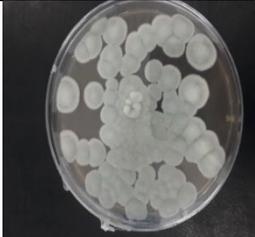
Figure 02 : Résultat du test catalase des isolats bactériens

III.2.2. Identification des isolats fongiques

a) Observation macroscopique

Les caractères macroscopiques des différents isolats fongiques sont étudiés sur milieu gélosé (Sabouraud). Le tableau VI regroupe les photos de l'aspect macroscopique des mycéliums, la vitesse de croissance, la texture, la couleur du mycélium et la couleur du revers des boîtes de Pétri.

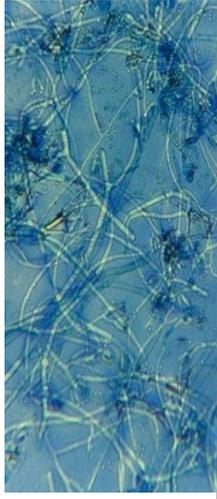
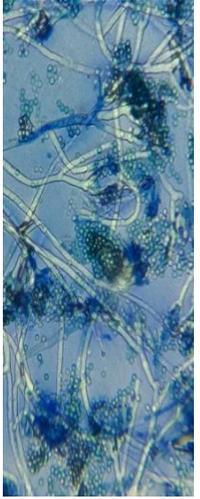
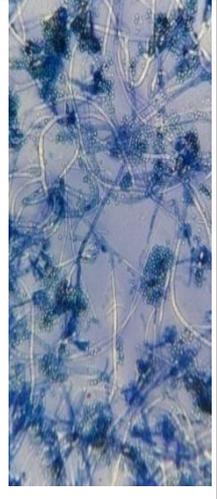
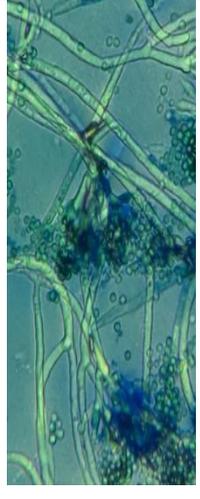
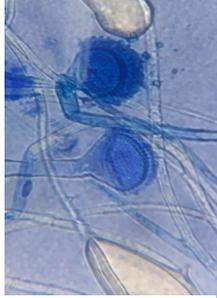
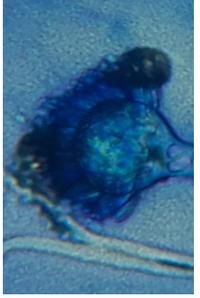
Tableau V : Observation macroscopique des isolats fongiques sur milieu Sabouraud.

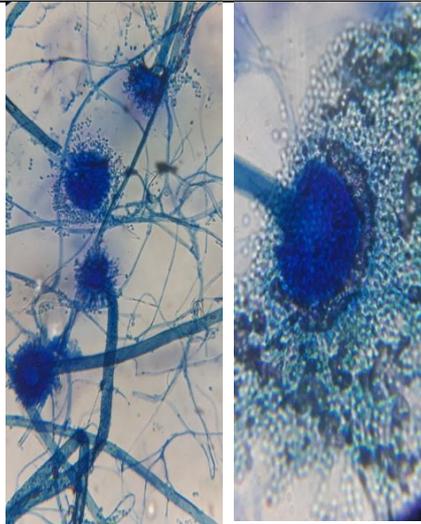
Code de l'isolat	Vitesse de croissance	Texture	Couleur de revers	Couleur de face	Photos obtenus	
					Face	Revers
C1EC (28°C)	Croissance moyenne	Veloutée à poudreuse	Jaune	Vert avec contour blanc		
C2EC (28°C)	Croissance rapide	Veloutée à Poudreuse	Marron jaune foncé	Brun verdâtre avec contour blanc		
C3EC (28°C)	Croissance rapide	Cotonneuse	Jaune	Blanche avec contour blanc		
C4EA (28°C)	Croissance moyenne	Cotonneuse	Jaune	Blanche beige avec contour blanc		

b) Observation microscopique

L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques des quatre isolats fongiques, les résultats ont permis de noter deux genres de moisissures (tableau VI).

Tableau VI : Caractéristiques microscopique des isolats fongiques.

Souches	Aspect microscopique	Genre	Photos obtenus	
			Grossissement 16X40	Grossissement 16X100
C1EC (28°C)	Conidiophores : isolés, simple sou ramifiés, terminés par un pénicille. phialides : branché directement à l'extrémité du conidiophore. Conidies : disposées en longue chaîne, globuleuses, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses.	<i>Penicillium</i> sp.		
C2EC (28°C)	Conidiophores : isolés, simple sou ramifiés, terminés par un pénicille. phialides : branché directement à l'extrémité du conidiophore. Conidies : disposées en longue chaîne, globuleuses, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses.	<i>Penicillium</i> sp.		
C3EC (28°C)	Tête : bisériée. Vésicule : globuleuse. Conidies : petites. Conidiophore : lisse.	<i>Aspergillus</i> sp.		

C4EA (28°C)	Thalle: septé. Conidiophore : lisse, et long. Vésicule : globuleuse. Phialides : portées par des métules insérées sur la partie supérieure de la vésicule. Conidies : globuleuses à légèrement elliptiques. Tête aspergillaire : bisériée, en colonne évasée.	<i>Aspergillus sp.</i>	
------------------------------	--	------------------------	--

L'étude macroscopique et microscopique effectuée sur les isolats, a abouti à la répartition de ces derniers en deux genres *Aspergillus sp* et *Penicillium sp*.

Ces genres fongiques sont présents dans la majorité des sols de toutes natures (**Alvarez-Rodriguez et al., 2002**) et les genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont des souches autochtones, habituellement isolées à partir de la plupart des terrains (**Boiron, 1996**).

Le nombre et l'activité de ces populations changent d'une région à une autre, il peut être influencé par le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et bien d'autres facteurs (**Ruark et Zarnoch, 1992 ; Madigan et al., 1997 ; Subler et Kirsch, 1998 ; Smith et al., 2000**).

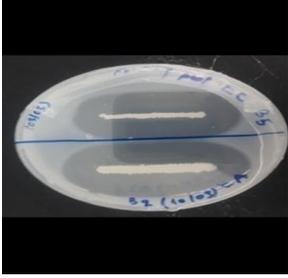
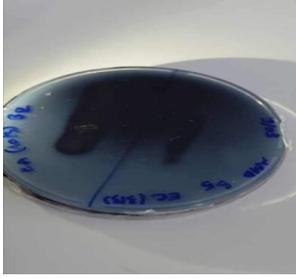
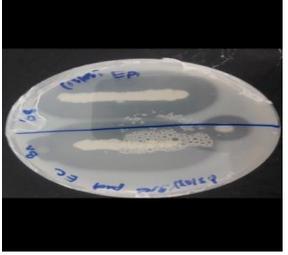
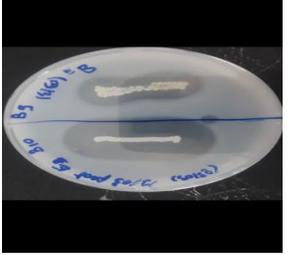
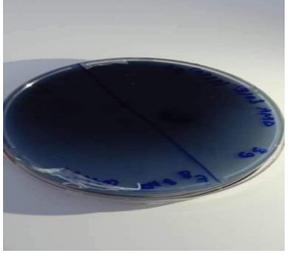
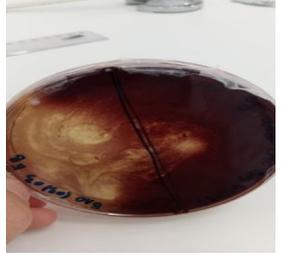
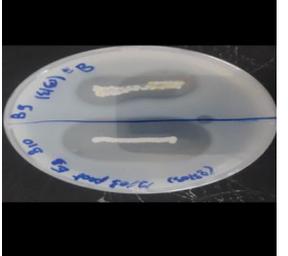
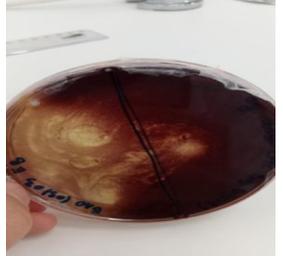
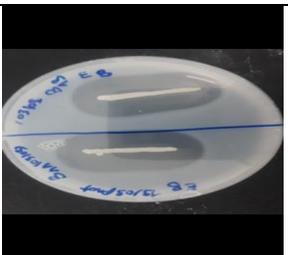
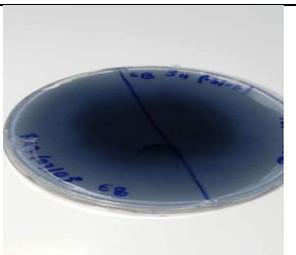
III.3. La mise en évidence des activités enzymatiques

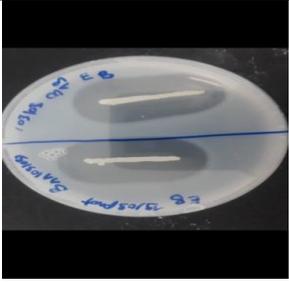
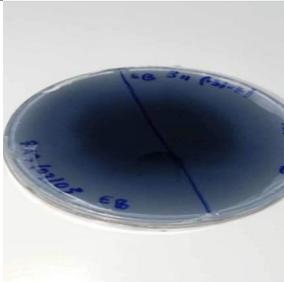
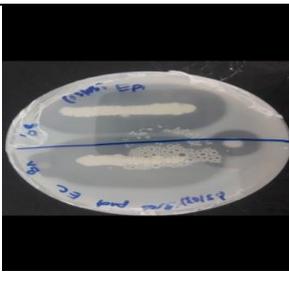
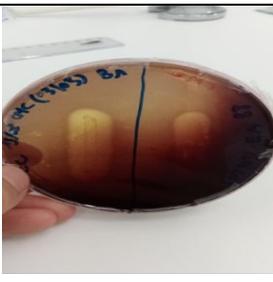
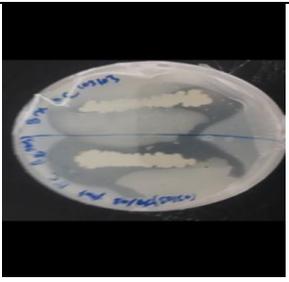
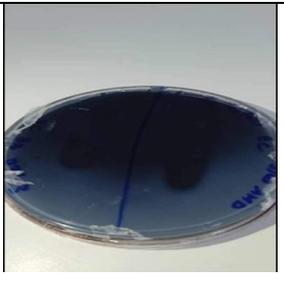
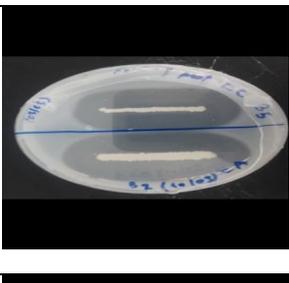
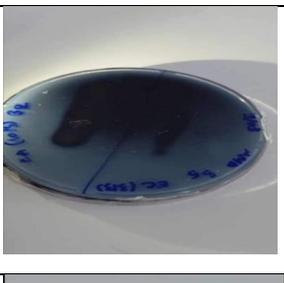
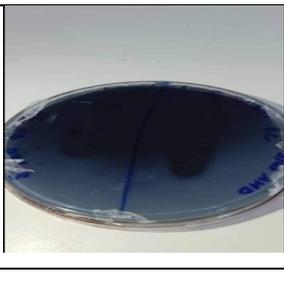
Le choix du milieu de culture est déterminant dans la mise en évidence de l'activité enzymatique recherchée et surtout dans le choix de substrat inducteur. Pour cela, on a utilisé différents milieux tels que le milieu gélosé à base de cellulose (CMC) 1%, milieu gélosé contenant 1% de lait écrémé et un milieu contenant de l'amidon soluble à 1%, comme milieux sélectifs pour la détection des activités cellulolytique, protéolytique et amylolytique respectivement, chez les quatre isolats fongiques et les dix isolats bactériens.

a) Chez les bactéries

Après incubation à 37°C pendant 48h. Les résultats sont regroupés dans les tableaux VII et la figure 03.

Tableau VII : Résultats de la mise en évidence des trois activités enzymatiques des isolats bactériens.

Isolats	Protéase	Amylase	Cellulase
B2EA			
B8EA			
B9EB			
B10EB			
B11EB			

B13EB	 A top-down view of a Petri dish with a blue agar surface. A blue line is drawn across the center. There are two white streaks on the agar. Handwritten text in blue ink is visible around the perimeter.	 A side view of the Petri dish B13EB, showing the blue agar surface and the blue line. The dish is held at an angle.	 An inverted view of the Petri dish B13EB, showing the underside of the agar surface. The blue line and white streaks are visible from below. The dish is held by a hand.
B1EC	 A top-down view of a Petri dish with a blue agar surface. A blue line is drawn across the center. There are two white streaks on the agar. Handwritten text in blue ink is visible around the perimeter.	 A side view of the Petri dish B1EC, showing the blue agar surface and the blue line. The dish is held at an angle.	 An inverted view of the Petri dish B1EC, showing the underside of the agar surface. The blue line and white streaks are visible from below. The dish is held by a hand.
B2EC	 A top-down view of a Petri dish with a blue agar surface. A blue line is drawn across the center. There are two white streaks on the agar. Handwritten text in blue ink is visible around the perimeter.	 A side view of the Petri dish B2EC, showing the blue agar surface and the blue line. The dish is held at an angle.	 An inverted view of the Petri dish B2EC, showing the underside of the agar surface. The blue line and white streaks are visible from below. The dish is held by a hand.
B5EC	 A top-down view of a Petri dish with a blue agar surface. A blue line is drawn across the center. There are two white streaks on the agar. Handwritten text in blue ink is visible around the perimeter.	 A side view of the Petri dish B5EC, showing the blue agar surface and the blue line. The dish is held at an angle.	 An inverted view of the Petri dish B5EC, showing the underside of the agar surface. The blue line and white streaks are visible from below. The dish is held by a hand.
B7EC	 A top-down view of a Petri dish with a blue agar surface. A blue line is drawn across the center. There are two white streaks on the agar. Handwritten text in blue ink is visible around the perimeter.	 A side view of the Petri dish B7EC, showing the blue agar surface and the blue line. The dish is held at an angle.	 An inverted view of the Petri dish B7EC, showing the underside of the agar surface. The blue line and white streaks are visible from below. The dish is held by a hand.

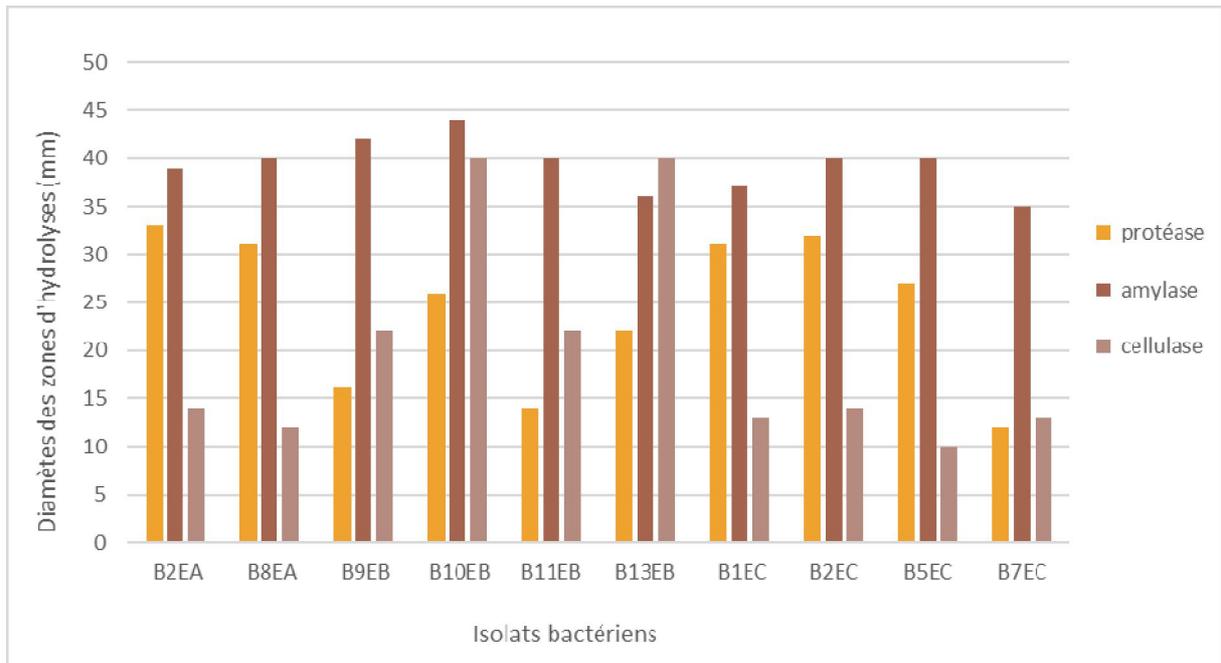


Figure 03 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats bactériens

B) Chez les champignons

Après incubation à 28°C pendant 48h. Les résultats sont regroupés dans le tableau VIII et la figure 04.

Tableau VIII: Résultats de la mise en évidence des trois activités enzymatiques des isolats fongiques.

Isolats	Protéase	Amylase	Cellulase
C1EC			
C2EC			

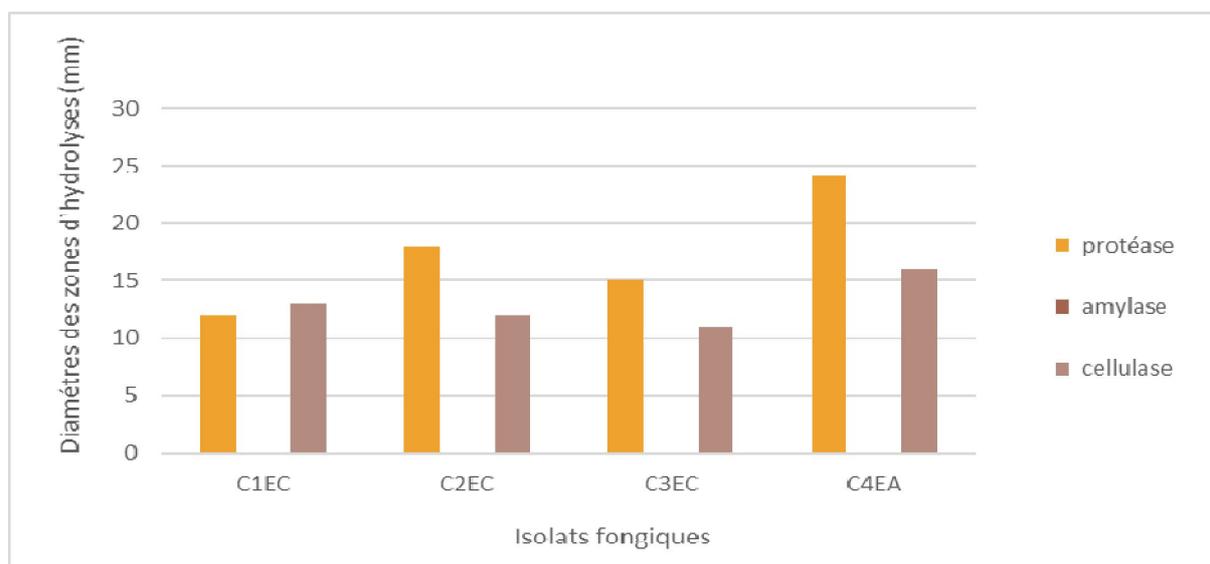
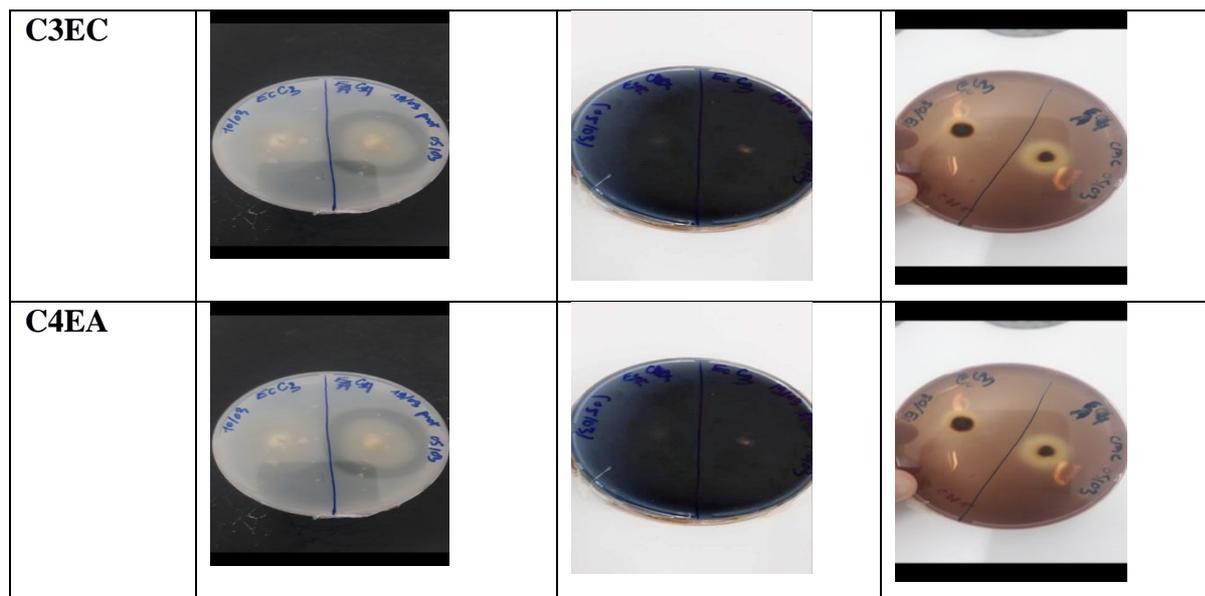


Figure 04 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats fongiques.

Les souches protéolytiques sont reconnues par la formation d'un halo transparent autour des colonies, résultant de la dégradation par la protéase des protéines du lait dans le milieu : plus le halo est grand, plus la quantité d'enzyme produite est importante.

Les isolats sont caractérisés par des zones d'hydrolyse de 12 mm jusqu'à 33 mm de diamètre (Tableaux VII, VIII, et les figures 03, 04). Ceci indique une utilisation des sucres totaux présents dans le lait comme source de carbone et d'énergie, ou par la production d'une activité protéolytique endo-cellulaire (**Debananda et al., 2009**).

D'après les résultats obtenus de l'activité amylolytique, nous avons remarqué que les 4 isolats fongiques ne possèdent aucune activité amylolytique. Mais les isolats bactériens ont montré des zones d'hydrolyse de 35 mm à 40 mm de diamètre et plus, cela indique la forte

capacité des isolats à hydrolyser l'amidon contenu dans le milieu (Tableaux VII, VIII, et les figures 03,04). En effet, l'étude réalisée par (**Tatsinkou et al., 2005**) a décrit la capacité de certaines souches fongiques productrice de l'alpha amylase dans les mêmes conditions expérimentales que ce travail.

D'après les résultats obtenus tous les isolats ont montré une activité cellulolytique, rapportés dans les tableaux (Tableaux VII, VIII, et les figures 03,04). Les diamètres obtenus vont de 10mm à 40mm. Cela indique la capacité des isolats obtenus à produire une cellulase. L'apparition d'une zone d'hydrolyse autour des colonies indique la synthèse de cellulase extracellulaire (**Saini et al., 2017**).

D'après nos résultats, tous les isolats obtenus possèdent un bagage enzymatique très développé, Le bagage enzymatique des microorganismes est directement influencé par la disponibilité des nutriments dans l'environnement et fait partie de l'adaptation de ces microorganismes à leur milieu naturel. Autre point important, il semble qu'une plus grande adaptabilité de certaines souches aux conditions de température et de pH a une relation avec la capacité de ces mêmes souches à produire des enzymes extracellulaires une plus grande capacité d'adaptation implique des mécanismes métaboliques plus développés comparativement à des organismes qui en sont dépourvus (**Cohen, 2011**). Ces derniers seront confrontés à un milieu moins favorable, lorsqu'ils sont exposés aux mêmes conditions environnementales.

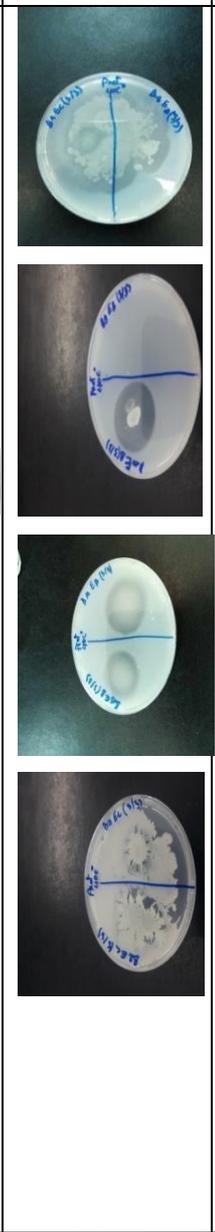
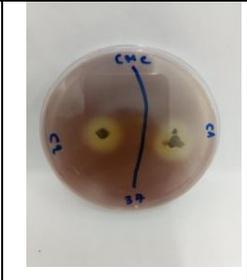
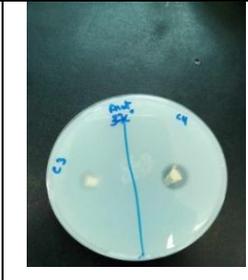
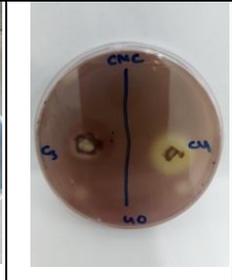
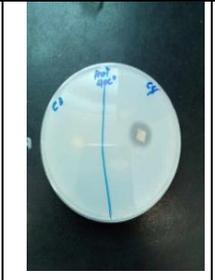
23

III.4. Effet des paramètres physicochimiques sur l'activité enzymatique

III.4.1. Effet de la température sur l'activité enzymatique

Les résultats de l'effet de la température sur l'activité enzymatique des différents isolats bactériens et fongiques précédentes sont rassemblés dans le tableau IX.

Tableau IX : Résultats d'effet de la température sur l'activité enzymatique.

Températures	28C°			40C°		
Isolats bactériens	Cellulase	Protéase	Amylase	Cellulase	Protéase	Amylase
	  	  				
Isolats fongiques						

24

Sur les figures suivantes sont indiquées les résultats des activités enzymatiques, la présence ou l'absence de zones d'hydrolyse pour les isolats bactériens et fongiques après 48 heures d'incubation à la température 28C° et 40°C pour les bactéries et 37°C, 40C° pour les champignons.

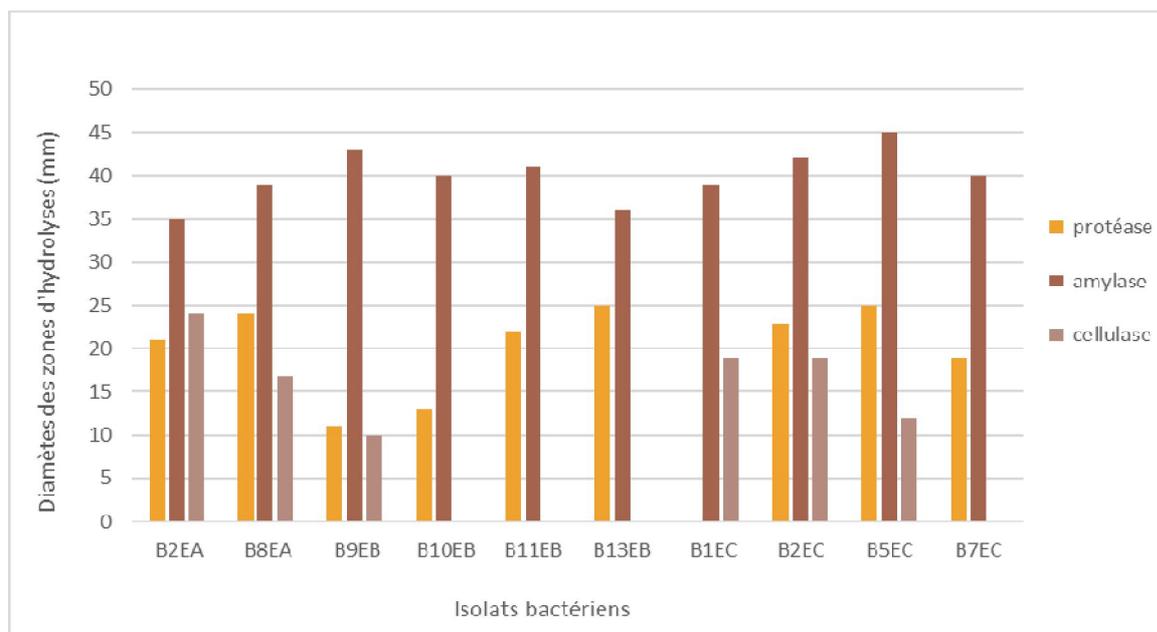


Figure 05 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats bactériens à température 28 C°.

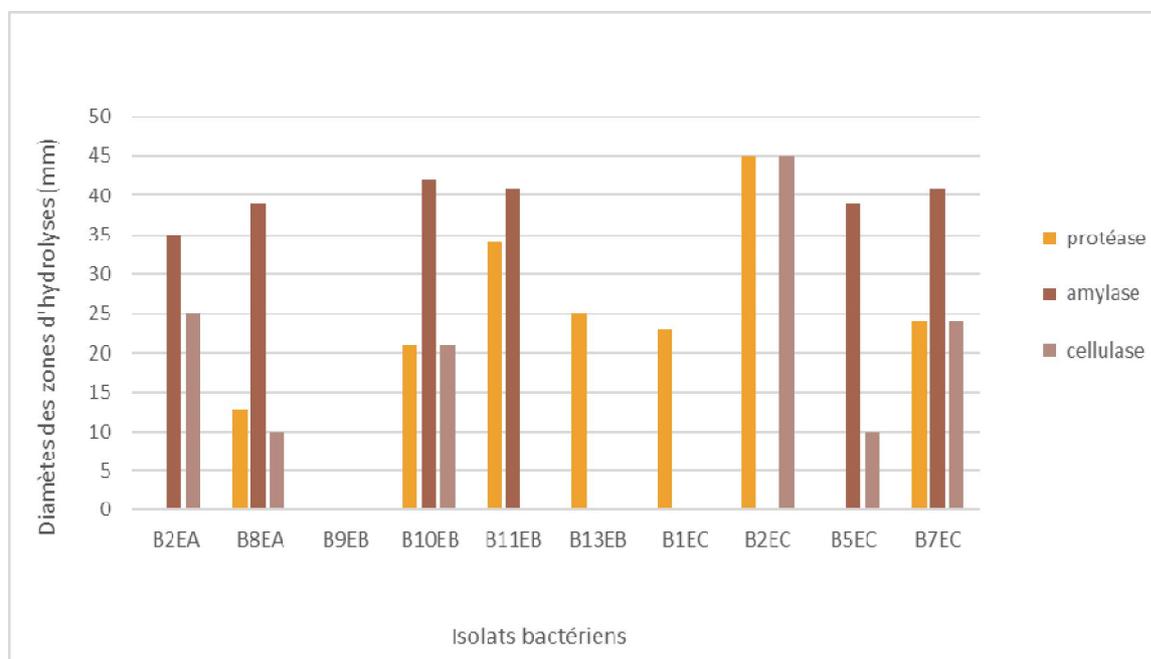


Figure 06 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats bactériens à température 40 C°.

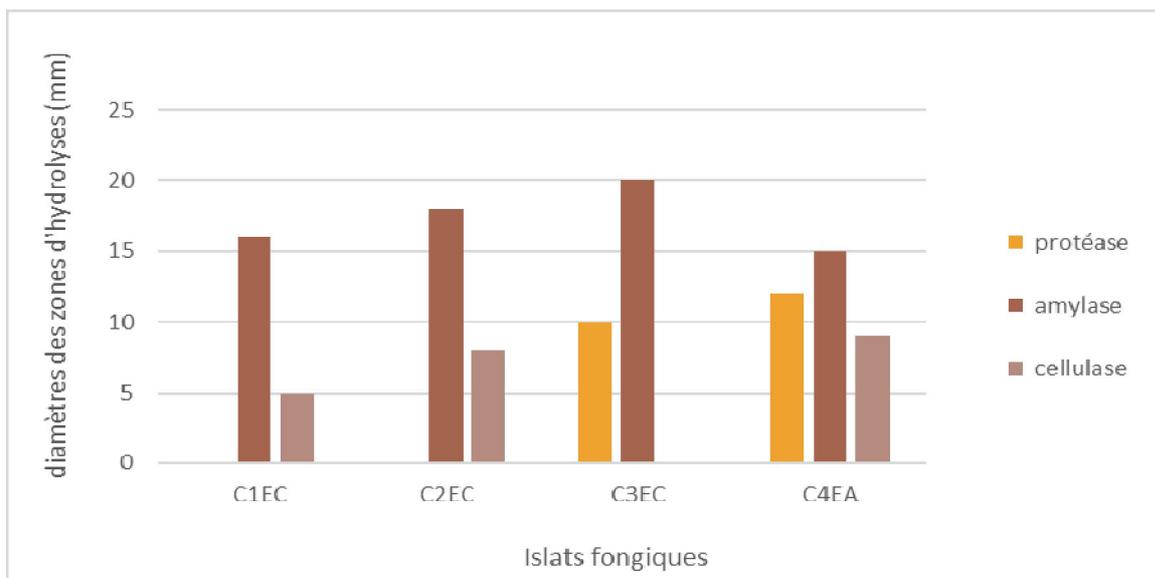


Figure 07 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats fongiques à température 37 C°.

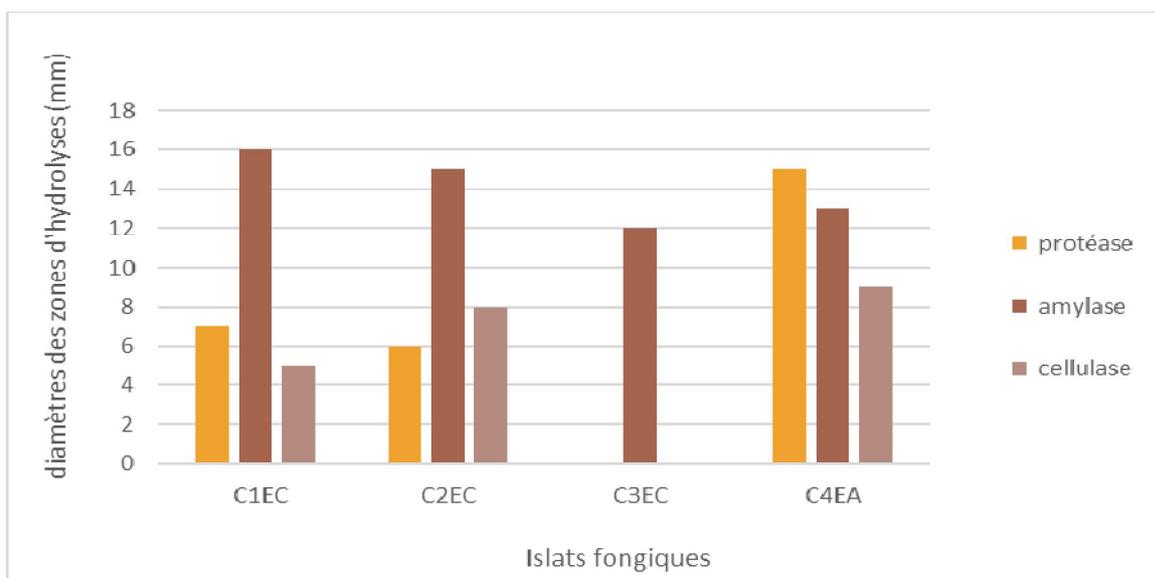


Figure 08 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats fongiques à température 40 C°.

La température est un facteur qui joue un rôle très important sur l'activité protéolytique, car elle a une influence directe sur la sécrétion extracellulaire de l'enzyme par accélération de la vitesse de la réaction enzymatique avec une modification des propriétés physiques de la membrane cellulaire. L'élévation de la température dans certaines limites a pour effet d'augmenter l'activité des enzymes. En effet, elle affecte la production de protéase pour induire ou réprimer leur synthèse (Nardello *et al.*, 2003).

La plupart des isolats ont montré une activité amylolytique protéolytique et cellulotiques soit à 28°C ou à 40 °C pour les bactéries, et à 37°C et 40°C pour les

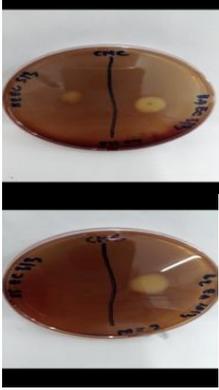
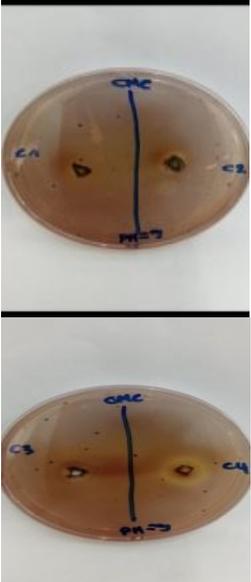
champignons, notamment pour l'activité amylasique, tous les isolats ont montré une activité aux différentes températures testées.

Selon l'étude de (Nandi et al.,2022) l'amylase d'origine *Aspergillus oryzae* a montré la meilleure activité entre 30°C et 60°C avec une activité optimale à 50°C. Comme la plupart des enzymes sont de nature protéique, la thermo-tolérance affecte toujours l'activité optimale.

III.4.2. Effet du pH sur l'activité enzymatique

Les résultats de l'effet du pH sur l'activité enzymatique des différents isolats précédents sont rassemblés dans le tableau X.

Tableau X : Résultats de l'effet du pH sur l'activité enzymatique à différents pH.

PH	5			9		
Isolats	Cellulase	Protéase	Amylase	Cellulase	Protéase	Amylase
bactériens	Négatif	Négatif	Négatif		Négatif	
Isolats fongiques						

Sur les figures suivants sont indiquées les résultats des activités enzymatiques, la présence ou l'absence de zones d'hydrolyse pour les isolats bactériens et fongiques après 48 heures d'incubation à la température 37C° pour les bactéries et 28C° pour les champignons à pH = 5 et pH=9.



Figure 09 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats bactériens à pH=5.

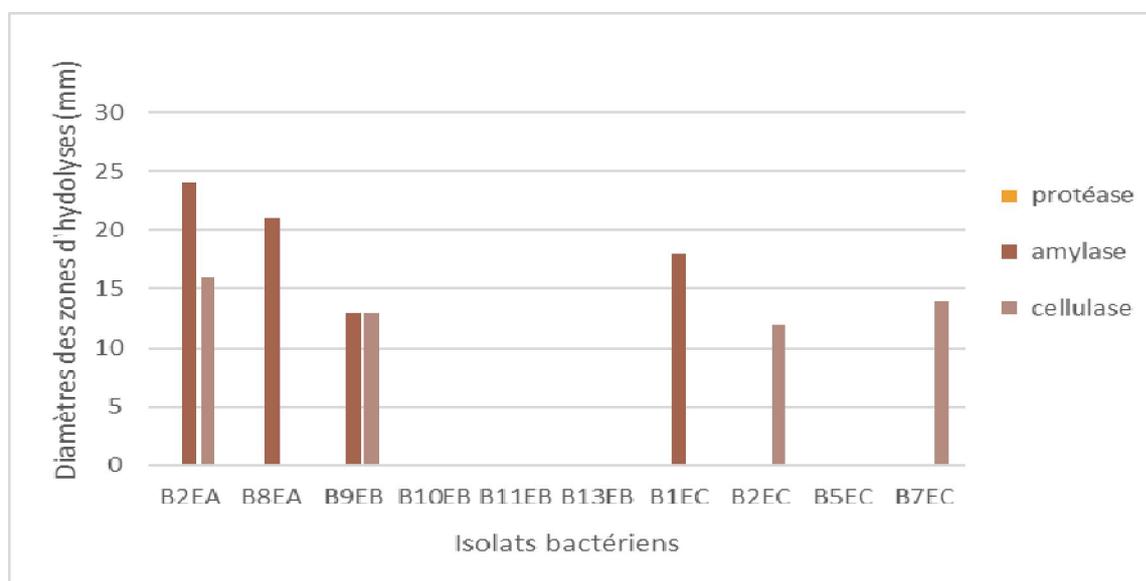


Figure 10: Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats bactériens à pH=9.

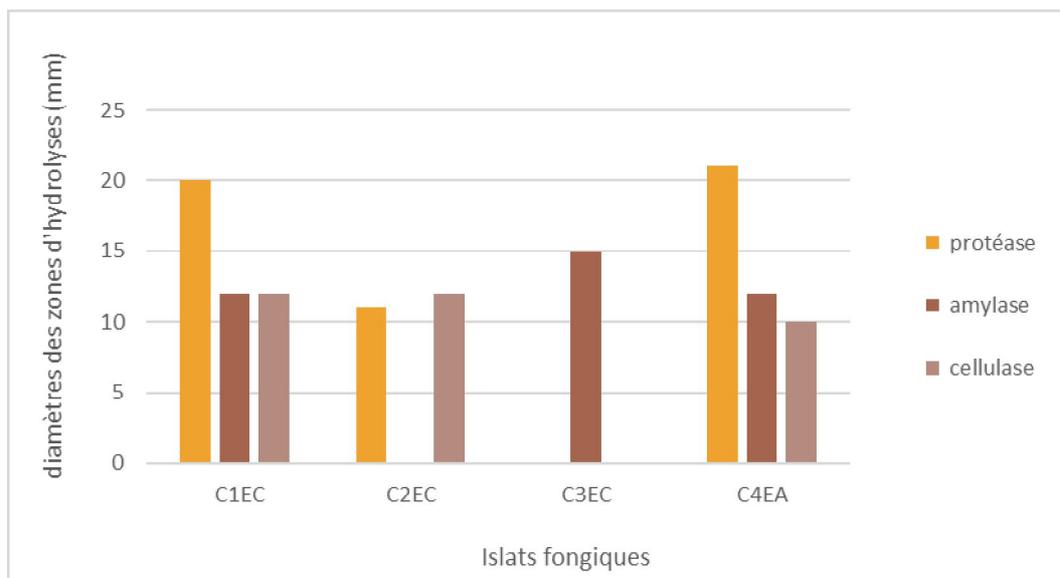


Figure 11 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats fongiques à pH=5.

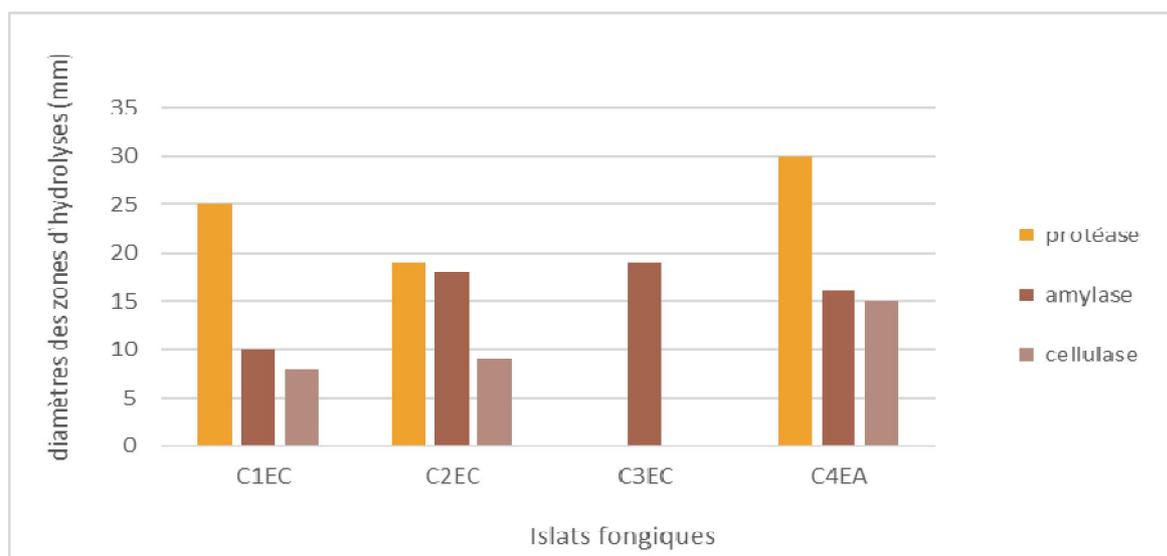


Figure 12 : Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats fongiques à pH=9.

Les résultats obtenus ont montré que tous les isolats bactériens ne montrent aucune activité enzymatique (amylolytique, protéolytique et cellulolytiques) à pH =5, quatre isolats montrent une activité cellulosique et amylasique à pH = 9.

Pour les champignons, les résultats obtenus montrent une activité enzymatique à pH=5 et à pH= 9, notamment le champignon **C4EA** (*Aspergillus sp.*) ou toutes ses enzymes (amylase, protéase et cellulase) gardent leur activité aux deux pH choisis.

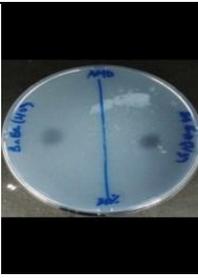
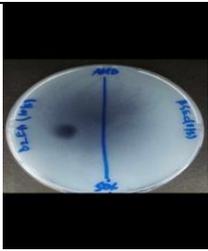
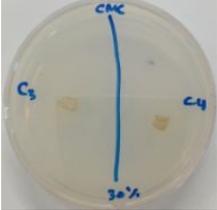
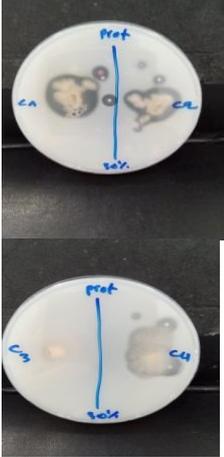
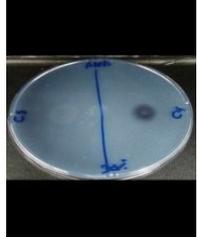
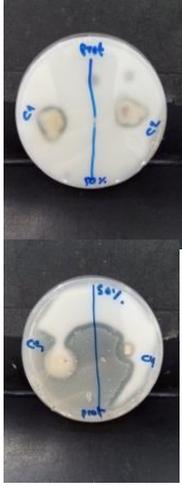
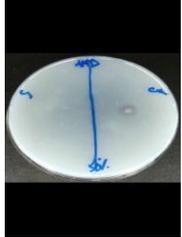
En effet, les variations du pH sont des indicateurs des changements dans les activités métaboliques car, le pH du milieu est affecté par les processus métaboliques, notamment enzymatiques (Sandhya et al., 2005).

Nos résultats corroborent avec ceux de l'étude de (Lynd *et al.*,2002), qui ont montré que la plupart des cellulases produites par les différents microorganismes étudiés possèdent des activités entre les valeurs du pH de 3à7.

III.4.3. Effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique

Les résultats de l'effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique des différents isolats sont rassemblés dans le tableau suivant.

Tableau XI : Résultats de l'effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique.

Concentrations	3%			5%		
	Cellulase	Protéase	Amylase	Cellulase	Protéase	Amylase
Isolats Bactériennes	Négatif	Négatif		Négatif	Négatif	
Isolats Fongiques						

Les figures suivantes indiquent les résultats des activités enzymatiques, la présence ou l'absence de zones d'hydrolyse pour les isolats bactériens et fongiques après 48 heures d'incubation à 37C° pour les bactéries et 28C° pour les champignons, à des concentrations de substrat de 3% et 5% pour chaque substrat (CMC, amidon et caséine du lait).

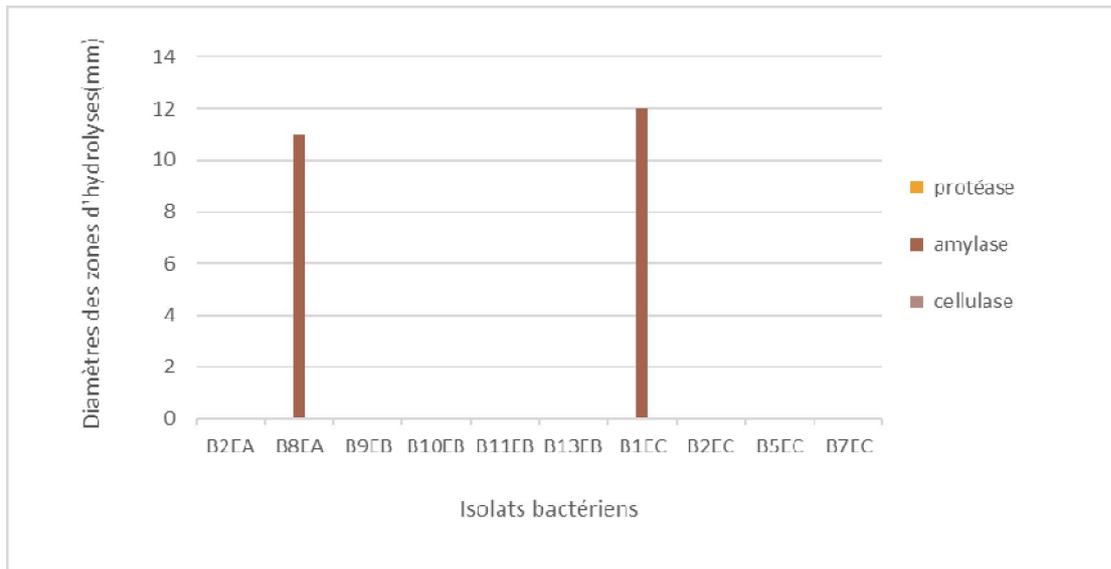


Figure 13: Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats bactériens à concentration de substrat de 3%.

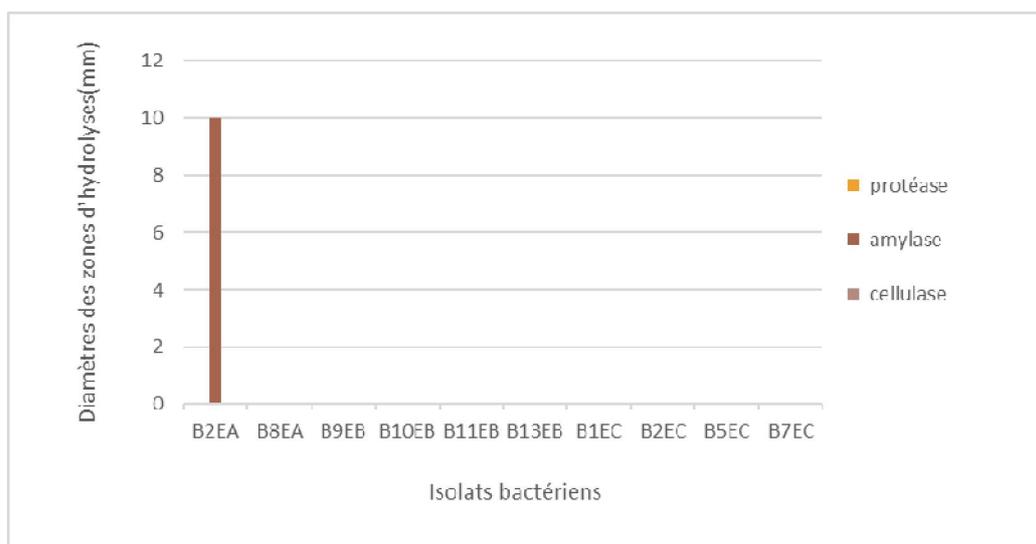


Figure 14: Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats bactériens à concentration de substrat de 5%.

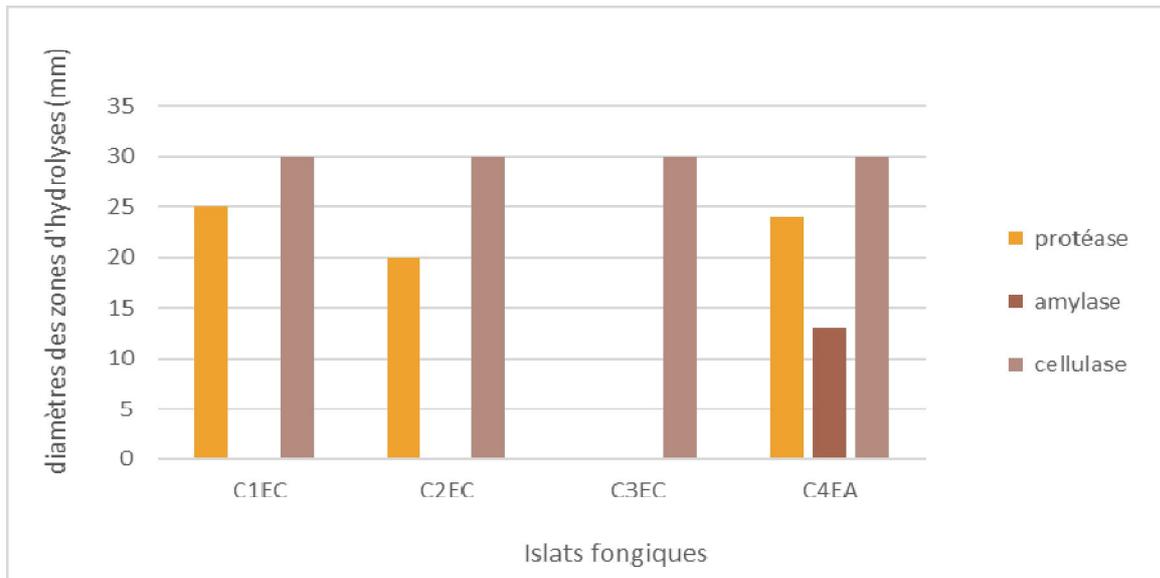


Figure 15: Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats fongiques à concentration de substrat de 3%.

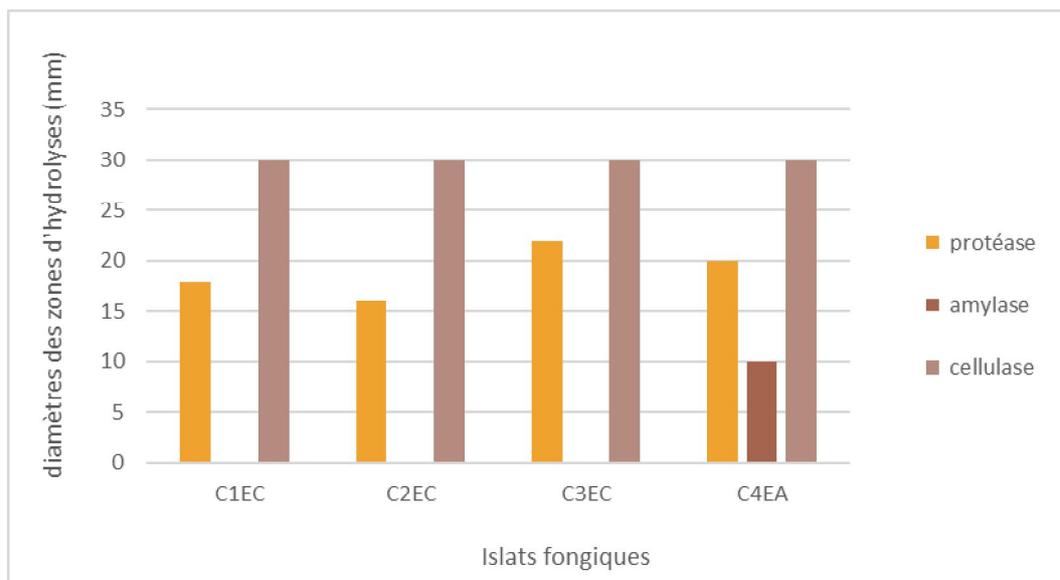


Figure 16: Diamètres des zones d'hydrolyses des isolats fongiques à concentration de substrat de 5%.

Les isolats bactériens ne montrent aucune activité enzymatique sauf les deux isolats **B8EA** et **B1EC** qui ont montré une activité amylasique à une concentration de substrat de 3% et l'isolat **B2EA** qui a montré une activité amylasique à une concentration de substrat à 5%.

Concernant les isolats fongiques, l'isolat **C4EA** a montré une activité enzymatique pour les trois enzymes aux concentrations de substrat de 3% et 5%. Les deux isolats **C1EC** et **C2EC** ont montré une activité protéasique aux concentrations de 3% et 5%.

Cela peut s'expliquer par les théories de base de l'activité enzymatique qui postulent - lorsque la concentration du substrat est élevée, toute l'enzyme reste comme complexe substrat-enzyme, c'est-à-dire que l'enzyme entière dans le milieu est saturée par le substrat. En conséquence, comme la concentration du substrat augmente, l'activité enzymatique augmente jusqu'à un certain point, après quoi elle diminue (**Nandi et al.,2022**).

Conclusion

IV- Conclusion

Durant les trois dernières décennies, les microorganismes ont apporté une contribution significative dans certains domaines industriels et en particulier agroalimentaire. Diverses industries dépendent en grande partie de leurs métabolites tel que les enzymes, ce sont les outils-clés des biotechnologies car elles offrent de nombreuses possibilités d'applications dans différents domaines. (Ibukun et Akindumilz, 1998).

Dans le but de rechercher des microorganismes capables de produire des enzymes, deux prélèvements ont été effectués à partir de deux régions différentes de la wilaya de Bordj Bou Arreridj à savoir la forêt de Boummergued et Zemmoura.

Les milieux de culture utilisés pour l'isolement et purification des souches sont le Sabouraud pour les champignons et le GN pour les bactéries. Après la purification, on a obtenu 04 souches fongiques et 10 souches bactériennes.

L'identification par une étude macroscopique, complétée par une étude microscopique, assigne que les isolats fongiques appartiennent aux genres *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.* La majorité des isolats bactériens sont immobiles à Gram positif ou négatif, sous forme de bacilles ou de coccobacilles. Cinq souches en catalase positif et cinq négatif.

Par ailleurs, une mise en évidence de la production de trois enzymes hydrolytiques extracellulaires (protéase, amylase et cellulase) par les isolats obtenus. Pour la mise en évidence de l'activité enzymatique, différents milieux gélosés contenant chacun le substrat de l'enzyme (caséine, amidon et CMC). Les isolats bactériens et fongiques ont montré des activités enzymatiques intéressantes. Les résultats ont montré que la meilleure activité enzymatique a été observée à pH=7 et 9 pour les enzymes fongiques, à une température de 37°C et à une concentration du substrat de 1% ; pH 7, 28°C et une concentration de 1% de substrat pour les enzymes bactériennes. En concluant que chaque enzyme possède des paramètres physicochimiques optimaux qui lui sont propres.

Tous ces résultats ouvrent des nouvelles perspectives et recommandations qui doivent être accomplies:

- Une identification de l'espèce des souches isolées.
- Une purification plus poussée des ces enzymes et l'étude des domaines d'application et mécanisme d'action notamment pour les enzymes fonctionnant à pH alcalin.

**Références
bibliographiques**

Abdesselam N., Latache N. E. H., (2017). Identification et caractérisation des bactéries isolées à partir de différents sols, Diplôme de Master En Biologie Option Microbiologie, Université de Tlemcen. p.18.

Alvarez –Ropdriguez M.L., Lopez-Ocana L., Lopez C., Rodriguez N.E., Martinez M.J., Larriba G., Coque J-J.R., (2002). Cork taint of wines: role of filamentous fungi Isolated from rock in the function of 2,4,6- Trichloroanisol by O methylation of 2,4,6 – Trichlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*.68 (12) :5860-5869.

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

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M. &Ouzrout, R., (2005).Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolée sà partir de lait cru de cheverde deux populations caprines locales" arabia et kabyle". *Sciences &Technologie*.30-37.

Berry D., Paterson A., (1990).Enzymes in food industry. In Suckling C.J. *Enzymes chemistry: impact and application*. Ed. Chapman H. London. 306-351 P. Cité par BenaouidaK. (2008).

Bhat M. K., Bhat S., (2000).Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*. 15(3-4): 583-620.

Bhunja, B., Basak, B., Chakraborty, S., Dey A., (2014).A review on application of microbial protease in bioremediation. *Industrial & Environmental Biotechnology*, Chapter 14.

Boiron P., (1996).Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan.P : 13- 80. Bordas. Paris. P. 36-153.

Chenel,J.P.,(2005).Production d'enzymes protéolytiques par des bactéries non conventionnelles isolées de boues d'épuration municipales. Institut National de la Recherche Scientifique (Canada).

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

Chi Z., Ma C., Wang P., Li H. F., (2007). Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresource Technology*, 98; 534–538.

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.

Dakhmouche.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.

Das, G., Prasad, M.P., (2010). Isolation, purification & mass production of proteases enzyme from *Bacillus subtilis*. *Int. Res. J. Microbiol.*, 1 (2), 26-31.

Debananda S., Pintubala K., Suchitra S., Salam N. (2009). Screening, identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkali thermotolerant indigenous actinomycetes. *World. Appl. Sci. J.*, 7: 907-916

De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B., (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 ed., The Firmicute. Springer. New York. Volume Three. 63-67.

Dvail, S., Grety J., et Lenzini M., (2010). Les actinomycètes, source de biomolécules d'intérêt industriel. Haute école de la province de Liège.

El enshasy, H., Abuoul-Enein, A., Helmy, S., El Azaly Y., (2008). Optimization of the industrial production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in different production scales. *Australian J. Basic. Appl. Sci.*, 2 (3), 583-593.

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

Gordonr E., Haynesw C., Pang C.H.N., (1973). The Genus *Bacillus* (Agricultural Handbook no. 427). Washington DC: United States Department of Agriculture.

Granner D. K., Murray R. K., Rodwell V. W., (2008).Biochimie de HARPER. 3ème édition. De Boeck. Bruxelles., 47. pp. 49-51, 483.

Gregoire P., Fardeau ML., Guaso S., Bouanane A., Michotey V., Bonin P., Dubourg K., Cambar J., Ollivier B., (2009).Les micro-organismes de l'extrême. Presstherm climat. 146: 49-61.

Gupta R., Gigras P., Mohapatran H., Goswami K.V., Chauhan B., (2003).Microbial α -amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry* 38: 1599-1616.

Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002).Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), 15-32.

Hasper A. A., Dekkers E., Mil M. V., Van de Vondervoort P.J. I., De Graaff L. H., (2002). EglC, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4):1556-1560.

Ibukun, E. O. etAkindumila, F., (1998).Extracellular amylase production by isolates of Bacilli micro-organism cultured on different starchy food broths. *The Nigerian Society of Biochemistry and Molecular Biology*, 13, 91-95.

Janecek S., 1994, Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal α -amylases. *Eur. J. Biochem.* 224, p : 519–524.

Joffin J.N., Leyral G., (2006). Microbiologie technique : dictionnaire de techniques. 4ème éd. Espagne : Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine.363 p.

Joo, H., Kook, B., Park, K.I., Bae, S.H., Yun J.W., Chang, C.S., Choi, J.W., (2007). Cloning and expression of the cathepsin F-like cysteine protease gene in *Escherichia coli* and its characterization. *J. Microbiol.*, 45(2), 158-167.

Kader A.J., Omar O., and Feng L.S., (1999).Isolation of cellulolytic fungi from the bario Highlands, Sarawak. University of Kebangsaan, Malaysia. *Review of Biodiversity and Environmental Conservation*.

KorishM., (2003). Production, purification, properties and application of the cellulose from a wild type strain of a yeast isolate. Faculty of biology, Johannes Gutenberg-University, mainz, germany.

Krishna, K.V., Gupta, M., Gaudani, H., Trivedi, S., Patil P., Gupta, G., Khairnar Y., Borasate A., Mishra, D., (2009). Optimization of growth and production of protease by *Penicillium* species using submerged fermentation. *Int. J. Microbiol. Res.*, 1, 14-18.

Larpent G .M et Sanglier J. J., (1992). *Biotechnologies. Principes et méthodes.* P : 574-581.

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

Lynd.L.R., Weimer P. J., Vanzyl W. H., Pretorius L.S., (2002). *Microbial Cellulose Utilisation: Fundamentals and Biotechnology.* *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3);p:506-577.

Madigan M.T., Matinko J.M and Parker J., (1997). *Brok biology of microorganisms*, 8 Edition. USA.

Mouria B., Ouazzani-Touhami A., Douira A., (2013). Isolement et identification de la mycoflore du compost des déchets urbains solides. *Revue « Nature et Technologie ».* C-Sciences de l'Environnement 09 : pp. 13-28.

Multon J., (1992), Le sucre, les sucres, les édulcorants et les glucides de charge dans les IAA, Collection sciences et techniques agro-alimentaires. Ed. Tec & doc.

Nandi S., Bose T., Mahato S., Chatterjee S., Chatterjee A., (2022). Isolation and partial characterization of amylase produced by fungal isolates from the agro-industrial waste source. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 10(4) ;45-49.

Nardello V., Salager J. L., Aubry J. M., (2003). Propriétés amphiphiles des tensioactifs de la famille du monolaurate de polyglycérol et application à la préparation de microémulsions à base d'esters gras, *Oléagineux, Corps Gras et Lipides*, 10, 382-386.

Nigam P S., (2013). *Microbial Enzymes with special characteristics for Biotechnological Applications.* *Biomolecules*, 3: 597-611.

Nielsen J, E., Borchert T, V. Vriend, G., (2001). The determinants of α -amylase pH activity profiles. *Protein Engineering*, Oxford University Press. 14(7) :505-512.

Ram S., Taranjeet S., Ashok P., (2019).Microbial Enzymes-An Overview. ELSEVIER, Inbook: biomas, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzymes Technology, Ed:1: p1-40.

Ruark G. H., Zarnoch S. J., (1992). Soil carbon, nitrogen and fine root biomass sampling in a pine stand. Soil Sc. Soc. Am.J. 56 :1945-1950.

Saini A., Aggarwal N. K., Yadav A., (2017). Isolation and screening of cellulose hydrolyzing bacteria from different ecological niches, Bioengineering and Bioscience 5(1): 7-13.

Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., Pandey, A., (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation.Proc. Biochem., 40; 2689–2694.

Saranraj P., Stella D. (2013). Fungal amylase: a review. *Int J Microbiol Res*, 4 :203-211.

Stanley, D., Farnden, K. J., & MacRae, E. A. (2005). Plant α -amylases: functions and roles in carbohydrate metabolism. *Biologia*, 60(16), 65-71.

Schwarz W. H., (2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56 : 634-649.

Scriban, R., (1993). Biotechnologie 4e. Technique et Documentation. *Lavoisier*.

Siala, R., Kamoun, A.S., Hajji, M., Abid, I., Gharsallah, N., Nasri, M., (2009). Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* I 1: purification and characterization. *African J. Biotechnol.*, 8 (18), 4582-4589.

Sicard P., (1982). Applications industrielles des enzymes. In : Les enzymes production et utilisations industrielles. Durand G., Monsan P. Ed. Gauthier – Villars, Paris. 164p.

Singh S., Sharma V., Soni M., DAS S., (2011). Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2 :486-496.

Singleton P., (2005). Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies, DUNOD. Paris.

Smith, A. D., (2000). Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press.

Smith n R., Gordon R.E., Clark F.E., (1952). Aerobic spores-forming bacteria. J. Appl. Bact. 27: 78-99.

Subler S., Kirsh K.S., (1998). Spring dynamic of soil carbon, nitrogen and microbial activity in earthwarmmiddles in no-tillcornfield. Bio. Fert. Soils. 26 :243-249.

Sundus F., Fazal M.A., Masjuki H.H., (2017)., Évaluations des énergies renouvelables et durables 70, 399-412, 2017 V. N. Jisha et al. / Advances in Enzyme Research 1 39-51.

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

Tankeshwar A., (2013). Catalase test: principle, uses, procedure and results. Biochemical Tests for Gram Negative Bacteria.

Tatsinkou F.B., Taveai F. and Ndjouenkeui R., (2005). Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. African Journal of biotechnology., 4(1), P: 14-18.

Tuncer M., Balli A. S., Rob A., Wilson M. T, (1999). Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a *termophilicactino mycete Termomonospora fusca* BD25. *Enzyme and Micribiol Technology*, 25:38-47.

Van Behen J. B. and Z. Li., (2002). Enzyme technology: an overview. *Biotechnology*, 13:338-344.

Van Der Maarel MJ, Van der Veen B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H. etDijkhuizen L., (2002). Properties and applications of starch converting enzymes of alpha amylase family. *Biotechnol* ; 94.

VermaM., (2007). Developpement d'un processus d'obtention d'agents biologiques à base de *Trichodermappp* en utilisant des eaux usées ou des boues d'épuration comme substrats de fermentation. Thèse de doctorat, Université du Québec, Canada, 424p.

Vidaud C., (1984). Contribution à l'étude de l'introduction du système cellulasique de *Trichodermapsp*. Parutilisation d'analogie de substrat thiosaccharidique. Thèse de 3eme Cycle. Université de Grenoble.

Xu.B., (2002).Endoglucanase and Mannanase from Blue Mussel, *Mytilusedulis*: Purification, Characterization, Gene and Three-Dimensional Structure. Thèse de doctorat.Faculty of Science and Technology, Uppsala University, Sweden.

Annexes

Annexe 01 : Matériel

1. Etuve (Incubateur)
2. Autoclave
3. Vortex
4. Bain marie
5. Distillateur
6. Plaque chauffante
7. Balance électrique
8. pH mètre
9. Micropipette
10. Bec Bunsen
11. Micropipette
12. Réfrigérateur

Annexe 02 : Solutions

- Eau physiologique

Chlorure de sodium.....9g
Eau distillée.....1000ml

Annexe 03 : Milieux pour l'isolement et la purification

- Gélose nutritive (GN) :

Tryptone05g
Extrait de viande03g
Chlorure de sodium.....05g
Agaragar bactériologique..... 12g
Eau distillée1000ml
pH= 7

Sabouraud (Sab)

Chlorure de sodium	5g
Agar/agar bactériologique.....	15g
Digestat pancréatique de caséine:.....	05g
Digestatpepsique de viande.....	05g
Glucose (ou Dextrose)	36,4g
Eau distillée.....	1000ml

pH= 5 ,6

Annexe 03 : Milieux pour les tests enzymatiques

La gélosé au 1% de lait écrémé

Agar.....	18g
Eau distillée.....	1000ml
Lait écrémé	10ml

pH= 7

La gélosé au 3% de lait écrémé

Agar.....	05 g
Eau distillée.....	200 ml
Lait écrémé	6 ml

pH= 7

La gélose au 5% de lait écrémé

Agar.....	05g
Eau distillée.....	200 ml
Lait écrémé	10 ml

pH= 7

La gélose au 1% d'amidon

Agar	18g
Eau distillée	1000ml
Amidon soluble	10g

pH=7

La gélose au 3% d'amidon

Agar	3,7 g
------------	-------

Eau distillée 200. ml
Amidon soluble 6 g
pH= 7

La gélose au 5% d'amidon

Agar 3,7 g
Eau distillée 200ml
Amidon soluble 10 g
pH= 7

La gélose à 1% de CMC

Agar18g
Eau distillée1000ml
CMC.....10g
pH=7

La gélose à 3% de CMC

Agar3 ;7g
Eau distillée200 ml
CMC..... 6g
pH= 7

La gélose à 5% de CMC

Agar3,7g
Eau distillée200ml
CMC.....10g
pH= 7