

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun-Tiaret
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

GAHLOUZ NADJET

Thème

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES BACTERIES PRODUCTRICES DES
PROTEASES A INTERET INDUSTRIEL

Soutenu publiquement le 12/07/2021

Jury:

Grade

Président: Dr. HOUCINE L.

MCA, faculté SNV, Université IBN Khaldoune, Tiaret

Encadrant: Dr. LARADJ ZAZOU K.

MAA, faculté SNV, Université IBN Khaldoune, Tiaret

Examineur : Dr. BOUBKEUR B.

MCA, faculté SNV, Université IBN Khaldoune, Tiaret

Année universitaire 2020-2021

Remerciements

Je remercie ALLAH, le tout puissant, qui nous aide et nous donne patience et courage durant les moments difficiles.

Je tiens d'abord à remercier infiniment mon encadrant de mémoire, Mme LARADJ ZAZOU pour ses constantes orientations durant mes travaux de laboratoire, sa méticuleuse attention, pour ses conseils, sa disponibilité et son extrême amabilité malgré sa grande charge de travail.

J'adresse ainsi mes vifs remerciements pour M Hocine L. d'avoir accepté de présider mon jury, malgré ses multiples occupations.

Je remercie également Mme Boubakeur B. qui a bien voulu faire partie de mon jury et d'examiner ce mémoire.

Merci à mes professeurs qui m'ont donné le savoir durant ma formation universitaire. Je tiens à remercier ma famille pour leur soutien moral et leur patience tout au long de mon travail.

Dédicace

*C'est avec profonde gratitude et sincères mots,
Que je dédie ce travail de fin d'étude à mes chers
parents, qui ont sacrifié leur vie pour ma
réussite et qui m'ont éclairé le chemin par leurs
conseils judicieux. J'espère qu'un jour, je pourrai
leurs rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour
moi, que Dieu leur prête bonheur et longue vie.*

*je dédie aussi ce travail à mon frère Hamou,
mes sœurs, mes beau frère et a mes petits
neveux qui m'ont soutenue et ont cru en moi.*

*Et pour terminer je dédie ce travail à tous mes
amis pour le support moral, l'encouragement et
la compréhension qu'ils m'ont offerts tout au
long de mes études.*

Résumé

La production des protéases par les bactéries est la plus utilisée au niveau d'industrie des enzymes. Par ailleurs, l'emploi des protéases et des autres enzymes est actuellement limité par leurs coûts de production élevés. Afin de faire face à ce problème, les producteurs d'enzymes et la communauté scientifique effectuent des recherches pour trouver des processus de production moins coûteux et plus rentable.

Trois (3) échantillons ont été prélevés à partir des sols riches en déchets protéiques dans la région de Tiaret (laiterie, abattoir et station d'épuration des eaux usées) afin d'isoler des bactéries à fort pouvoir protéolytique. Le screening primaire a permis l'isolement de six(6) souches bactériennes productrices de protéases sur un milieu gélosé additionné de 1 % de lait écrémé. Plusieurs tests biochimiques ont été effectués afin de donner une orientation sur les espèces des bactéries isolées productrices des protéases (coloration de Gram, test de catalase, oxydase, mobilité et respiration). Le screening secondaire a permis la sélection de deux (2) souches bactériennes productrices des protéases comme étant les plus performantes.

Afin d'optimiser la production des protéases, certains paramètres de croissance ont été modifiés (température, pH et temps d'incubation) et l'activité protéolytique était évaluée par mesure de la zone d'hydrolyse.

Abstract

The production of protease by bacteria is among the most widely used enzyme production industrially. On the other hand, the use of proteases and other enzymes is currently limited by their high production costs. In order to lower these production costs, enzyme producers and the scientific community are carrying out research to find production substrates that are less expensive and capable of supporting the production of proteases.

Three (3) samples were taken from soils rich in protein waste in region of Tiaret (from the dairy, slaughterhouse, waste water treatment plant) in order to isolate powerful bacterial strains for proteases production. The primary screening allowed the selection of six (6) bacterial protease-producing isolates in agar plates supplemented with 1% of creamed milk, several biochemical tests were carried out to give an approximative orientation to the bacterial strains of the protease-producing isolates. Two (2) bacterial isolates were selected in the secondary screening as being the best performing protease-producing isolates.

In order to optimise the production of protease by the isolated bacterial strains, some growth parameters were modified (temperature, pH and incubation time) to assess the proteolytic activity of the strains by measuring the hydrolysis zone.

ملخص

يعد إنتاج الأنزيم البروتيني بواسطة البكتيريا من بين أكثر إنتاجات الإنزيمات استخدامًا في الصناعة ، ومن ناحية أخرى ، فإن استخدام البروتياز والإنزيمات الأخرى محدود حاليًا بسبب ارتفاع تكاليف إنتاجها. من أجل خفض تكاليف الإنتاج هذه ، يقوم منتجو الإنزيمات والمجتمع العلمي بإجراء أبحاث للعثور على ركائز إنتاج أقل تكلفة وقادرة على دعم إنتاج البروتياز. تم أخذ 3 عينات من تربة غنية بالنفايات البروتينية: الألبان ، المسلخ ، محطة معالجة مياه الصرف لإجراء دراسة ميكروبيولوجية وتحديد تنوع البكتيريا المحللة للبروتين. جعل الفحص الأولي من الممكن عزل 6 سلالات منتجة للبروتياز ، وتم إجراء العديد من الاختبارات البيوكيميائية ، من بين هذه السلالات الست تم اختيار 2 فقط في الفحص الثانوي على أنهما الأفضل أداءً. تم تعديل معلمات نمو معينة في درجة الحرارة ودرجة الحموضة ووقت الحضانة من أجل تقييم نشاط التحلل البروتيني للسلالات عن طريق قياس منطقة التحلل المائي.

Table de matière

Remerciement.....	I
Dédicace.....	II
Résumé.....	III
Abstract.....	III
ملخص.....	III
sommaire	IV
liste des abréviation	V
liste des tableaux.....	VI
liste des figures.....	VII
Introduction	1
Partie 1 : Etude Bibliographique	3
Chapitre 1.....	4
Rôle et actions des enzymes.....	4
1.1 .Origine des enzymes industrielles	4
2.Enzymes protéolytiques.....	5
2.1. Répartition des protéases dans le monde vivant.....	5
2.2 .Mesure de l'activité protéolytique	6
2.3. La physiologie de la production des protéases	6
2.3.1. L'influence du pH	6
2.3.2. Effet de la température.....	6
2.4. Applications industrielles des protéases	6
2.4.1 .Industrie alimentaire.....	6
2.4.1.1 .Préparation du fromage.....	6
2.4.2.2. Produits à base de soja	7
2.4.2.3 .Synthèse de l'aspartame	7
2.4.2. Domaine pharmaceutique et médical.....	7
2.4.3 .Traitement des eaux usées industrielles	7
Chapitre 2.....	8

3. ingénierie de protéases bactériennes	8
3.1 .Le genre <i>Bacillus</i>	8
3.1.1. Caractéristiques générales	8
3.1.2. Taxonomie.....	8
3.1.2.1 Taxonomie phénotypique.....	8
3.1.2.2. Taxonomie génotypique	8
3.1.3. Caractéristique de croissance	9
3.1.4. La production de la protéase.....	9
3.2. Genre <i>Pseudomonas</i>	9
3.2.1. Taxonomie.....	10
3.2.1.1. Taxonomie phénotypique.....	10
3.2.1.2. Taxonomie génotypique	10
3.2.2. Caractéristique de croissance.....	10
3.2.3. Production de la protéase	11
Partie 2 : Etude Expérimentale.....	12
CHAPITRE 3 : Matériel et méthode.....	13
1.Objectifderecherche.....	12
2.Prélèvementetéchantillonnage.....	12
2.1. Présentation des sites de prélèvement.....	12
2.2 .Technique de prélèvement.....	15
3. Isolement des souches bactériennes productrices des protéases	15
3.1 Screening primaire.....	15
3.2 Purification et conservation des souches protéolytiques	16
4. Identification phénotypique des souches isolées et sélectionnées productrices de protéase	16
4.1. Examen macroscopique.....	16
4.2. Examen Microscopique.....	17
4.2.1. Observation microscopique à l'état frais.....	17

Table de matière

4.2.2. Coloration de Gram.....	17
4.3. Tests biochimiques et physiologiques	17
4.3.1. Test de catalase.....	17
4.3.2. Test d'oxydase	17
4.3.3. Détermination du type respiratoire.....	17
5. Le screening secondaire des souches isolées sélectionnées productrices de protéase.....	18
5.1. Mesure de la zone d'hydrolyse sur milieu de culture solide.....	18
6. Evaluation de l'activité protéolytique des souches isolées par variation des paramètres de croissance	18
6.1. L'étude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique des souches isolées productrices de protéases	18
6.1. L'étude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique des souches isolées productrices de protéases	19
6.3. L'étude de l'effet de la température sur l'activité protéolytique des souches isolées productrices de protéases	19
CHAPITRE 4 Résultat.....	20
1. Le screening primaire.....	21
2. L'identification phénotypique des souches isolées productrices des protéases	22
2.1 Caractères cultureux et biochimiques de la souche GPL-3.....	22
2.1.1. Aspect cultural	22
2.1.2 .Coloration de gram	23
2.1.3. Catalase	23
2.1.4. Oxydase.....	23
2.1.5. Type respiratoire	24
2.1.6. Mobilité	24
2.2. Caractères cultureux et biochimiques de la souche GPL-5.....	24
2.2.1. Aspect cultural	24

2.2.2 .Coloration de gram	25
2.2.3. Catalase	25
2.2.4. Oxydase	26
2.2.5. Type respiratoire	26
2.2.6. Mobilité	27
2.3. Caractères cultureux et biochimiques de la souche ABT -6	27
2.3.1. Aspect cultural	27
2.3.2 .Coloration de gram	27
2.3.3. Catalase.....	27
2.3.4. Oxydase	28
2.3.5. Type respiratoire	28
2.3.6. Mobilité.....	29
2.4. Caractères cultureux et biochimiques de la souche GPL-6	29
2.4.1. Aspect cultural	29
2.4.2 .Coloration de gram	29
2.4.3. Catalase	30
2.4.4. Oxydase	30
2.4.5. Type respiratoire	30
2.4.6. Mobilité	31
2.5. Caractères cultureux et biochimiques de la souche ABT-5	31
2.1.1. Aspet cultural	31
2.1.2 .Coloration de gram.....	31
2.1.3. Catalase	31
2.1.4. Oxydase.....	32
2.1.5. Type respiratoire	32
2.1.6. Mobilité	32

Table de matière

2.6. Caractères cultureux et biochimiques de la souche ONA-5	33
2.1.1. Aspect culturel	33
2.1.2 .Coloration de gram.....	33
2.1.3. Catalase	34
2.1.4. Oxydase.....	34
2.1.5. Type respiratoire	34
2.1.6. Mobilité.....	34
3. Le screening secondaire.....	35
4. Etude de l'activité protéolytique par modification des paramètres (Temps, température et pH).....	35
4.1 Etude de l'effet de la période d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches GPL-3 et ABT -6	36
4.2. L'effet du pH sur l'activité protéolytique chez les souches GPL-3 et ABT -6.....	37
4.3. L'effet de la température sur l'activité protéolytique chez les souches GPL-3 et ABT -6.....	38
Discussion générale	41
Conclusion	44
Référence bibliographiques	46
Annexes	53

Liste des abréviations

ABT : Abattoir.

ADN :Acide désoxyribonucléique.

ARN :Acide ribonucléique.

ARNr :Acide ribonucléique ribosomique.

AW :Activity Water (activité d'eau).

GPL :Giplait.

MAX :Maximum.

MIN : Minimum.

OPT : Optimum

TGEA : tryptone , glucose , extrait de levure , agar .

GN : gélose nutritive.

Liste des tableaux

Tableau 1 : caractéristiques de croissances des *Bacillus*.

Tableau 2 : caractéristiques de croissance des *Pseudomonas* .

Tableau 3 : calcul de l'index de l'activité protéolytique des souches productrices de protéase.

Liste des figures

Figure1 : réaction enzymatique

Figure 2 : présentation de la structure tridimensionnelle d'une protéase bactérienne

Figure3 : caractéristiques morphologique des *Bacillus*

Figure 4 : caractéristiques morphologiques des *Pseudomonas*

Figure 5 : Présentation du site de prélèvement effectué à partir de la laiterie Sidi Khaled (Giplait) de Tiaret.

Figure6 :Présentation du site de prélèvement effectué à partir de la laiterie Sidi Khaled (Giplait) de Tiaret.

Figure7 : Présentation du site de prélèvement effectué à partir de boue de la station d'épuration des eaux usées à Tiaret.

Figure8 : Présentation de site de prélèvement effectué à partir du sol d'un abattoir dans une ferme dans la région de Tiaret (ABT).

Figure9 : Présentaion des prélèvements des sols riches en protéines effectués à partir de différents sites.

Figure10 : Présentation de la technique de purification des souches isolées productrices des protéases

Figure 11: détermination du type respiratoire

Figure 12 : Illustration de zone d'hydrolyse après incubation de 48heures

Figure13 : Aspect macroscopique des souches isolées, sélectionnées productrices de protéase.

Figure 14 : Aspect macroscopique des souches après incubation sur milieu TGEA après 48heures **GPL-3**.

Figure15 : Coloration de gram et observation microscopique des souches isolées à partir de l'échantillon **GPL-3** (grossissement $\times 100$).

Figure16 : Test catalase effectué sur la souche **GPL-3**

Figure17 : Test oxydase effectué sur la souche **GPL-3**.

Figure18 : Illustration du test effectué pour voir le type de respiration de la souche **GPL-3**.

Figure 19 : Aspect macroscopique des souches après incubation sur milieu TGEA pendant 48heures **GPL-5**.

Figure20 : Coloration de gram et observation microscopique des souches isolées a partir de l'échantillon **GPL-5** (grossissement $\times 100$).

Figure21 : Test catalase effectué sur la souche **GPL-5**.

Figure 22 : Test oxydase effectué sur la souche **GPL-5**.

Figure23 : Illustration du test effectué pour voir le type de respiration de la souche **GPL-5**.

Figure 24 : Aspect macroscopique des souches après incubation sur milieu TGEA pendant 48heures **ABT -6**.

Figure25 : Coloration de gram et observation microscopique des souches isolées à partir de l'échantillon **ABT-6** (grossissement $\times 100$).

Figure 26 : Test catalase effectué sur la souche **ABT -6**.

Figure 27 : Test oxydase effectué sur la souche **ABT -6**.

Figure 28 : Illustration du test effectué pour voir le type de respiration de la souche **ABT -6**.

Figure 29 : Aspect macroscopique des souches après incubation sur milieu TGEA pendant 48heures **GPL-6**.

Figure30 : Coloration de gram et observation microscopique de la souche isolée à partir de l'échantillon **GPL-6** (grossissement $\times 100$).

Figure 31 : Test catalase effectué sur la souche **GPL-6**.

Figure32 : Test oxydase effectué sur la souche **GPL-6**

Figure33 : Illustration du test effectué pour voir le type de respiration de la souche **GPL-6**.

Figure 34 : Aspect macroscopique des souches après incubation sur milieu TGEA pendant 48heures **ABT-5**

Figure 35 : Coloration de gram et observation microscopique de la souche isolée à partir de l'échantillon **ABT-5** (grossissement $\times 100$).

Figure 36 : Test catalase effectué sur la souche **ABT-5**.

Figure37 : Test oxydase effectué sur la souche **ABT-5**.

Figure38 : Illustration du test effectué pour voir le type de respiration de la souche **ABT-5**

Figure39 : Aspect macroscopique des souches après incubation sur milieu TGEA pendant 48heures **ONA -5**.

Figure40 : Coloration de gram et observation microscopique des souches isolées à partir de l'échantillon **ONA-5** (grossissement $\times 100$).

Figure41 : Test catalase effectué sur la souche **ONA -5**.

Figure42 : Test oxydase effectué sur la souche **ONA -5**.

Figure43 : Illustration du test effectué pour voir le type de respiration de la souche **ONA -5**.

Figure 44 : Les différents résultats obtenus après variation des paramètres de croissance (pH, temps d'incubation et température)

Figure45 : Étude de l'effet de la durée d'incubation sur les souches productrices de protéase.

Figure46 : Étude de l'effet de variation de température sur les souches productrices de protéase pendant 24heures.

Figure 47 : Étude de l'effet de variation de température sur les souches productrices de protéase pendant 48heures.

Figure48 : Étude de l'effet de variation du pH sur les souches productrices de protéase pendant 24heures.

Figure49 : Étude de l'effet de variation du pH sur les souches productrices de protéase pendant 48heures.

Introduction

Introduction

L'accélération du développement des sociétés humaines a mené à une augmentation des demandes en matières premières, en produits et biens de consommation. Cette exigence a conduit les chercheurs à innover de nouveaux procédés de production et d'améliorer les processus déjà existant. Des alternatives biologiques sont conçues afin de résoudre ces problèmes, parmi ces alternatives : l'emploi d'enzymes microbiennes industrielles qui est très profitable à la fois sur le plan énergétique et sur l'aspect environnemental et économique. (**Mathieu Drouin, 2005**).

À cause de leurs nombreuses propriétés intéressantes, les enzymes microbiennes sont de plus en plus utilisées dans le monde industriel. En 1998, 75% des enzymes destinées à l'industrie étaient hydrolytiques (**Rao et al., 1998**) comme les lipases et les protéases produites par *Bacillus licheniformis* (**Mathieu Drouin, 2005**). Dans plusieurs procédés industriels, les réactions d'hydrolyse et d'oxydation sont normalement accomplies par des produits chimiques peu spécifiques qui occasionnent des pertes de rendements importantes et génèrent des sous-produits souvent difficiles et coûteux à éliminer. (**Mathieu Drouin, 2005**).

Les protéases microbiennes sont parmi les enzymes hydrolytiques les plus importantes, représentant l'un des plus grands groupes d'enzymes industrielles et représentant environ 60% des ventes totales d'enzymes dans le monde. La grande spécificité de l'action hydrolytique des protéases trouve des applications étendues dans différentes industries telles que l'alimentaire, la lessive, le cuire, la pharmacie et la soie ...etc.

L'intérêt de ce travail vise essentiellement cette optique, les objectifs tracés pour réaliser ce travail sont :

- L'isolement et le screening primaire des souches productrices de protéases à partir de sol riche en protéine.
- La sélection des souches protéolytique les plus performantes par mesure du diamètre de la zone d'hydrolyse.
- L'identification phénotypique des souches productrices des protéases les plus performantes.
- Variation des différents paramètres impliqués dans la production des protéases par les souches isolées et sélectionnées.

PARTIE I

Etude bibliographique

Chapitre 1

1. Rôle et actions des enzymes

Les enzymes sont des protéines de hautes masses moléculaires (10 000 à 100 000 daltons) et sont constituées de longues chaînes d'acides aminés unis par des liens peptidiques (Meunier, 1999). Ce sont des macromolécules qui appartiennent à la classe des protéines globulaires. Elles sont 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 (Mathieu Drouin, 2005). Autre fonction importante, les enzymes sont responsables de la dégradation des molécules complexes en molécules plus facilement assimilables.

Les enzymes agissent comme catalyseurs de plusieurs réactions chimiques. Une caractéristique importante des enzymes est leur très grande sélectivité à catalyser des réactions chimiques précises. En effet, contrairement aux agents chimiques qu'elles tendent à remplacer, les enzymes sont très spécifiques. De façon générale, la majorité des réactions enzymatiques peut être représentée de la façon suivante (Meunier, 1999) :

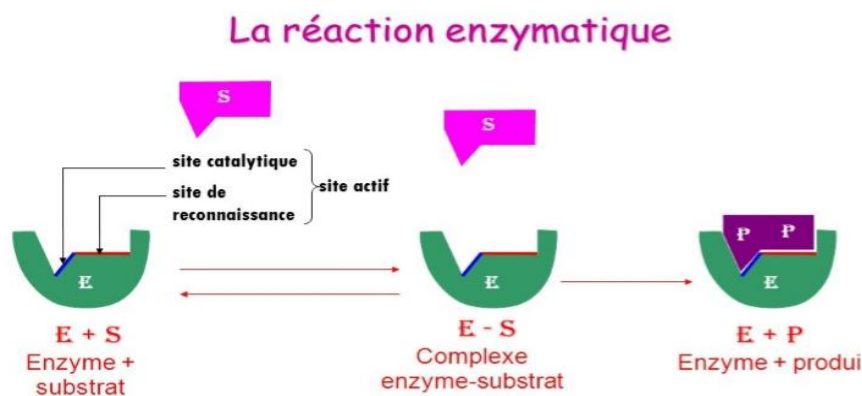


Figure1 : Réaction enzymatique (Breslow, 1998).

1.1 Origine des enzymes industrielles

Les enzymes industrielles sont d'origine végétale, animale ou microbienne (Meunier, 1999; Rao *et al.*, 1998; Coultouly, 1991). L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par des paramètres difficiles à contrôler. C'est pourquoi la production d'enzymes à partir de microorganismes est privilégiée par les producteurs puisqu'elle est plus facile à gérer avec des résultats plus constants (Meunier, 1999).

Les principaux avantages de la production des enzymes par l'utilisation des microorganismes sont les suivants :

- Croissance rapide sur des milieux de culture contenant des substances organiques moins coûteuses
- Elaboration de certaines biomolécules
- Culture facile et abondante
- Production de quantités abondantes d'enzymes.

2. Enzymes protéolytiques

Les protéases, ou enzymes protéolytiques, font partie des enzymes hydrolytiques. En effet, les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique.

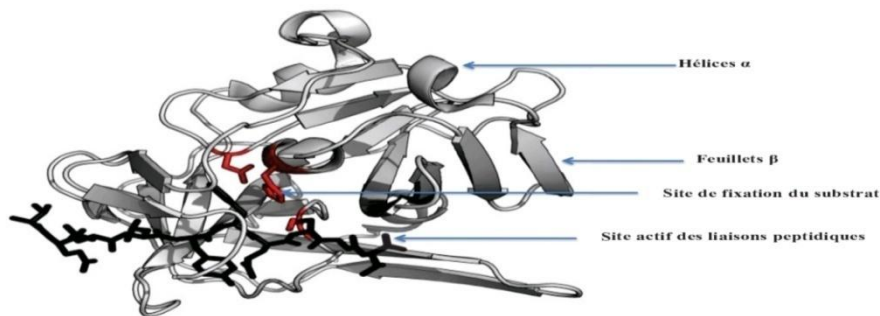


Figure 2 : présentation de la structure tridimensionnelle d'une protéase bactérienne (**Gordon et al ,2005**).

2.1 Répartition des protéases dans le monde vivant

Tous les êtres vivants contiennent des enzymes dans leurs cellules, ces molécules sont présentes sous des formes et des types différents. Il y a les protéases les amylases, les lipases, les phytases et les cellulases (**Sharma et al ; 2001 ; Ole et al ; 2002**). Ils peuvent être :

- D'origines végétales telles que la papaïne la bromélaïne...etc.
- D'origine animale dont les plus connues sont sécrétées par l'estomac des ruminants et présentent un intérêt industriel tel que la présure, la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine et la rénine (**Mathieu Drouin, 2005**).
- Les protéases d'origine microbiennes proviennent des microorganismes, ils sont d'origines bactériennes (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, etc.) ou fongiques (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, etc ; **Keay et al, 1969**)

2.2 Mesure de l'activité protéolytique

La mesure de l'activité protéolytique est procédé par des méthodes qualitatives, elles reposent sur l'analyse du diamètre de la zone claire d'hydrolyse formée sur la surface du milieu de culture gélosée, due principalement à la production de protéase (**Mathieu Drouin, 2005**).

2.3. La physiologie de la production des protéases

La production des protéases chez les bactéries est considérablement affectée par de nombreuses conditions telles que la valeur du pH du milieu de culture et de la température (**Kumar et Parrack, 2003**).

2.3.1 L'influence du pH

Le pH joue un rôle important dans la production des protéases, (**Calik et al ; 2002**) ont rapporté que la valeur du pH du milieu de culture a affecté considérablement les mécanismes de régulation métabolique de la production des protéases chez les bactéries. par ailleurs, (**Kembhavi et al, 1993**) et (**Hameed et al ,1999**) ont montré que la production de la protéase est maximale lors du contrôle des valeurs de pH du milieu de culture durant les phases de croissance . Des résultats similaire sont observés dans le milieu de culture durant les phases de croissance (**Kumar et Takaji ,1999 ; Gupta et al , 2002**) .

2.3.2 Effet de la température

La température constitue un facteur abiotique très important qui influence considérablement la production de la protéase chez les microorganismes mis en cause Cependant, les protéases sont produites à des intervalles de température variés selon la bactérie sélectionnée productrice (**Hmidet et al , 2009**).

2.4 Applications industrielles des protéases

2.4.1 Industrie alimentaire

2.4.1.1 Préparation du fromage

L'industrie fromagère emploie une quantité importante de protéases (**Rao et al., 1998; Fogarthy et Kelly, 1990**). Les protéases employées sont surtout des protéases acides. La majorité des protéases employées sont produites par *Mucor sp.*, *Bacillus subtilis* et *Endothicaparasitica*. Elles sont utiles pour la coagulation des protéines du lait.

2.4.2.2 Produits à base de soja

Des protéases neutres et alcalines sont utilisées pour préparer la sauce soja ainsi que d'autres produits à base de soja. Les modifications des protéines du soja par les protéases aident à augmenter leurs propriétés fonctionnelles. Ils sont utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et boissons fruitées et dans les formulations d'aliments diététiques (**Rao et al. 1998**).

2.4.2.3 Synthèse de l'aspartame

L'aspartame est un dipeptide composé d'un résidu acide L-aspartique et d'un résidu L-phénylalanine. La configuration en L de la molécule est responsable du goût sucré. Le maintien de cette configuration est donc crucial, mais engendre des coûts très importants lorsque des méthodes de synthèse chimiques sont employées. La synthèse enzymatique de l'aspartame est donc préférable. Si les protéases sont considérées comme des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse, sous certaines conditions bien précises. Une préparation immobilisée de thermolysin provenant de *Bacillus thermoprotolyticus* est utilisée pour la synthèse de l'aspartame (**Rao et al., 1998**).

2.4.2 Domaine pharmaceutique et médical

La grande diversité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Par exemple, des protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées comme aide à la digestion chez certains individus souffrant de déficits en enzymes lytiques au niveau du système digestif. Également, des collagénases provenant de *Clostridium sp.* Ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement de brûlures et de plaies. (**Kudrya et Simonenko, 1994**).

2.4.3 Traitement des eaux usées industrielles

Les protéases sont de plus en plus considérées comme un moyen efficace pour le traitement des rejets industriels. En effet, les protéases peuvent traiter les rejets riches en protéines. Des essais effectués dans différentes industries alimentaires produisant des rejets riches en protéines ont donné des résultats très intéressants, qui permettent de constater le potentiel des protéases pour le traitement de ces déchets (**Kumar et al., 1999**).

Chapitre 2

3. ingénierie de protéases bactériennes

3.1 Le genre *Bacillus*

3.1.1. Caractéristiques générales

Les *Bacillus* ce sont des bacilles à Gram positif, sporulé aérobie-anaérobie (inra,2011), à catalase positif et oxydase négatif , les *Bacillus* se distingue par de nombreux caractères tels que hétérogénéité sur le plan génétique et phénotypique notamment au niveau de leur distribution dans la nature et leur métabolisme (Gordon *et al* 1973 ; Claus et Berkeley ,1986) , ce genre présente plusieurs intérêt médicale, agronomique , pharmaceutique et industriel (Gordon *et al* 1973 ; Claus et Berkeley ,1986) .

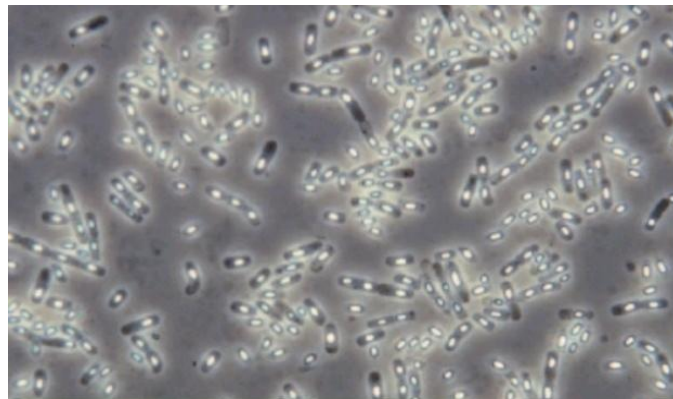


Figure3 : caractéristiques morphologique des *Bacillus* (inra ,2011).

3.1.2. Taxonomie

3.1.2.1 Taxonomie phénotypique

les *Bacillus* sont classés selon leurs morphologie, physiologie, critères biochimiques et nutritionnels (Snithet *al* ,1952 ; Gordon *et al.*,1973); Logan et Berkeley *et al.*, 1984 ; Stackbrandt *et al.*, 1987) , cependant , la classification la plus répandue est sur la forme des spores et qui sont classés en 3 groupes (Fritz , 2004) :

- Bacilles à spore ovale non déformante.
- Bacilles à spore ovale déformante .
- Bacilles à spore ronde déformante

3.1.2.2 Taxonomie génotypique

des études moléculaires basées sur la composition de l'ADN (Fahmy *et al* , 1985) ; cette classification est basée essentiellement sur 2 critères , croissance en aérobiose et formation d'une spore (Bergey 1986).

3.1.3. Caractéristique de croissance

Les caractéristiques de croissance de la souche *Bacillus* sont réparties dans le tableau 1 ci-dessous (donner variable selon le groupe génétique).

Tableau 1 : caractéristiques de croissances des *Bacillus* (Anses, 2011).

Paramètres	Min	Opt	Min
Température (C°)	Pour la majorité des souches, la température minimale est de 10	30-37	55
ph	4,3	6 -7	9,3
Aw	0,92	0 ,99-1	/
NaCl (g/L)	/	/	50

3.1.4. La production de la protéase

La production de la protéase commence durant la phase stationnaire chez l'espèce *Bacillus*, elle est influencée par les condition de culture . (Secades et Guijarro, 1999). la synthèse des protéases est relievé à la sporulation (Zouar et Jaoua, 1999) ; la protéolyse effectuée permet la fourniture des acides aminés nécessaire à la synthèse des protéines impliquées dans la formation des spores (Doi , 1972 ; Reddyet al,1998) .

3.2.Le Genre *Pseudomonas*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont ubiquitaires et présentent un intérêt particulier en microbiologie médicale, alimentaire, aquatique et environnementale ainsi qu'en agronomie, (Meghdas et al , 2004) elles sont capables de coloniser le sol, les tissus végétaux et animaux en décomposition, l'eau douce et l'eau de mer (Gaignard, and Luisetti, 1993; Peix et al., 2009). Certaines espèces de *pseudomonas* sont responsables des altérations des denrées alimentaires réfrigérées (Alquati et al ,2002). Certains sont pathogènes de l'homme, les animaux et des plantes (Akkermans et al 1996. Nishimori et al 2000 ; Munsch et alatosava, 2002) , cependant d'autre sont utiles et stimulent la croissance des plantes (Bouchez et al 1995 ; Johnsen et al 1996 ; Andersen et al 2000 ; Pandyet al 2002 ; Kesseruet al 2003).

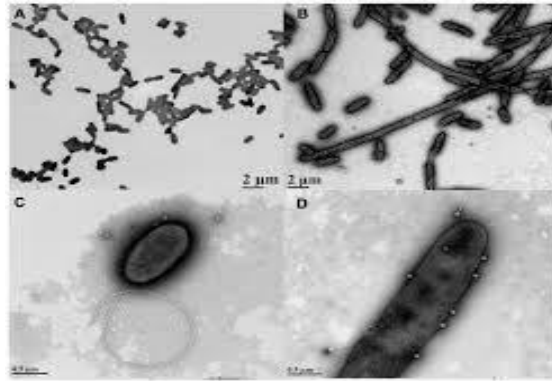


Figure 4 : Caractéristiques morphologiques des *Pseudomonas* (MDPI, 2020).

3.2.1 Taxonomie

Actuellement les bactéries du genre *Pseudomonas* correspondent à des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts, généralement mobiles grâce à des flagelles en position polaire (monotriche ou multitriche), catalase et oxydase positive (Manaia and Moore, 2002). La taxonomie de cette souche est basée sur des critères phénotypique et génotypique (Meghdas I et al; 2004).

3.2.1.1. Taxonomie phénotypique

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont classés selon leurs morphologie, physiologie, critères biochimiques et nutritionnels (Snithet al ,1952 ; Gordon et al ; Logan et Berkeley et al 1984 ; Stackbrandtet al 1987)

3.2.1.2. Taxonomie génotypique

Cette classification est basée sur la comparaison des séquences des gènes codant pour les ARN ribosomiaux (ARNr) (De Ley et De Smedt, 1975).

3.2.2. Caractéristique de croissance

Les différents caractéristiques de croissance des *Pseudomonas* sont réparties dans le tableau2 ci-dessous (donner variable selon le groupe génétique).

Tableau 2 : Caractéristiques de croissance des *Pseudomonas* (Anses, 2011).

Paramètres	Min	Opt	Min
Température (C°)	des températures relativement faibles mais non négatives, permettront une survie des souches	30-37	45
ph	4,5	6 -8	9
Aw	0,965	0 ,97	/

3.2 .2 Production de la protéase

Pseudomonas aeruginosa produit deux types de protéases : les métalloprotéases et les sérineprotéases avec une régulation par le *quorum-sensing* (**Toder et al 1991 ;Gambello et Iglewski , 1991 ;Gambello et al. ;1993**) .

CHAPITRE 3

Matériel et méthodes

1. Objectif de recherche

Les principaux objectifs de ce travail sont :

- L'isolement le screening des bactéries protéolytiques à partir des sols riches en protéines dans la région de Tiaret (laiterie, abattoir, station d'épuration des eaux usée).
- L'identification phénotypique des souches productrices de protéase les plus performantes.
- L'optimisation de quelques paramètres impliqués dans la production des protéases.

2. Prélèvement et échantillonnage

2.1 Présentation des sites de prélèvement



Figure 5 : Présentation du site de prélèvement effectué à partir de la laiterie Sidi Khaled (Giplait) de Tiaret.



Figure6 : Présentation du site de prélèvement effectué à partir de la laiterie Sidi Khaled (Giplait) de Tiaret.



Figure7 : Présentation du site de prélèvement effectué à partir de boue de la station d'épuration des eaux usées à Tiaret.(ONA)



Figure8 : Présentation de site de prélèvement effectué à partir du sol d'un abattoir dans une ferme dans la région de Tiaret (ABT).

2.2 Technique de prélèvement

Les prélèvements sont effectués avec une technique assez spécifique dans des conditions aseptiques. Tout d'abord, le sol est creusé à en virant (5 à 15cm) de profondeur avec une spatule stérile, une quantité du sol est ensuite prélevée et mise dans des crachoirs médicales stériles et étiquetés (l'endroit, heur et date). Les prélèvements sont transportés au laboratoire dans des glacières et conservés à 4°C jusqu'à leurs utilisation .

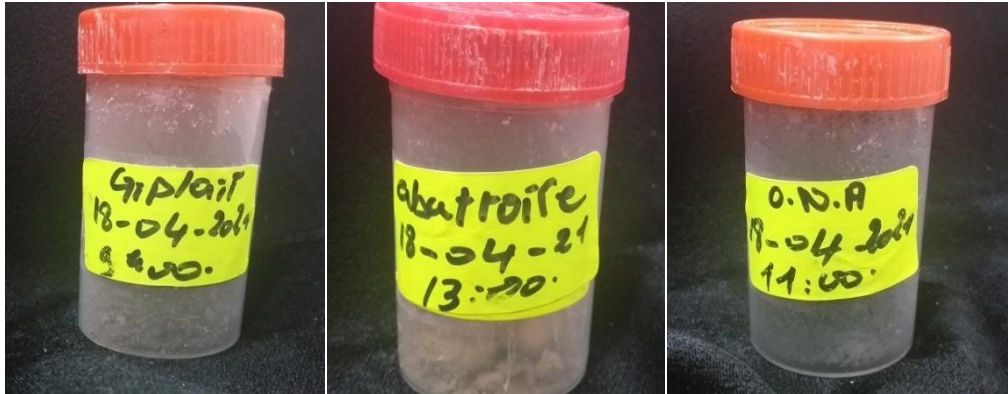


Figure9 : Présentaion des prélèvements des sols riches en protéines effectués à partir de différents sites.

3. Isolement des souches bactériennes productrices des protéases

3.1 Screening primaire

Dans le but d'isoler des souches bactériennes productrices des protéases, un gramme de chaque échantillon est prélevé aseptiquement à l'aide d'une spatule stérile et introduite dans 9 ml d'eau physiologique, les dilutions décimales sont préparées par la suite à partir des solutions mères.

Afin de sélectionner des bactéries qui ont la capacité de sporuler, les tubes des dilutions décimales ont subi une thermisation dans un bain Marie à une température de 80°C pendant 10 min (**Lynn et al.,1999**). L'isolement des souches protéolytiques est réalisé par étalement de 0.2 ml des dilutions avec et sans thermisation dans des boites pétries contenant le milieu de culture TGEA à 1 % de lait écrémé (**Annexe 1**) ; les boites inoculées sont incubées à une température de 30°C pendant 48h. Une lecture positive de la production des protéases se manifeste par l'apparition des zones claires (zones d'hydrolyse) autour de la colonie (**Facklamet al., 1989**) .

3.2 Purification et conservation des souches protéolytiques

Les souches isolées et sélectionnées productrices des protéases sont purifiées par des repiquages successifs 3 à 4 fois (méthodes des cadrans, **figure10**) sur la surface des boîtes de pétri contenant la gélose nutritive additionnée au lait écrémé à 1%. Les boîtes sont incubées après chaque repiquage à 30°C pendant 24h (**Yilmaz *et al.*, 2005**).

Les colonies des souches pures sont ensemencées dans la gélose nutritive inclinée additionnée au lait écrémé à 1%, après 24h d'incubation à 30°C les tubes sont conservés à 4°C, des repiquages réguliers sont effectués chaque 3 semaines de conservation (**Badiset *al.*, 2005**).

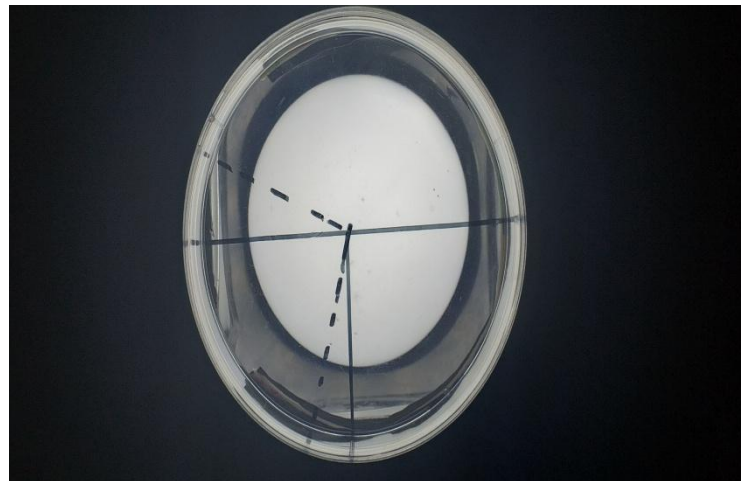


Figure10 : Présentation de la technique de purification des souches isolées productrices des protéases.

4. Identification phénotypique des souches isolées et sélectionnées productrices des protéases

L'identification des souches isolées sélectionnées productrices des protéases est basée sur l'étude des caractères macroscopiques (aspect des colonies, reliefs, bordure, couleur, élévation, opacité), l'étude microscopique (observation à l'état frais et coloration de Gram), études des enzymes respiratoires terminales (recherches de la catalase et de l'oxydase) et l'étude des différents caractères biochimiques.

4.1 Examen macroscopique

Pour déterminer les caractères morphologiques, les colonies des souches isolées sélectionnées productrices des protéases obtenues après 24h de culture sur gélose nutritive, sont observées à la

loupe binoculaire. Chaque colonie est examinée pour sa taille, sa couleur, ses contours, sa texture et sa forme et son relief.

4.2 Examen Microscopique

4.2.1 Observation microscopique à l'état frais

Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité. Déposer une goutte d'eau stérile sur la lame, prélever une fraction de colonies sur gélose de préférence aux bords de celle-ci, faire une suspension homogène dans la goutte d'eau en incorporant progressivement l'inoculum et en remuant très délicatement (afin de ne pas casser les flagelles). Recouvrir d'une lamelle en évitant la formation des bulles d'air. Ensuite, les cellules sont examinées au microscope optique (G x40 et x100).(Prescott W ; Sherwood W ;1993).

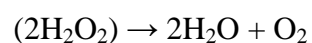
4.2.2 Coloration de Gram

Ce test a été réalisé sur des cultures jeunes de moins de 24 heures. Un frottis de cellules a été réalisé sur une lame. Une coloration de Gram a été effectuée. Ensuite, le frottis a été observé au microscope sous immersion au grossissement X 100. Les isolats ayant une coloration violette sont Gram positif (+) tandis que ceux présentant une coloration rose sont Gram-négatifs (-)(Touaitia R,2020).

4.3 Tests biochimiques et physiologiques

4.3.1 Test de catalase

La catalase est un enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante :



Une réaction positive de la présence du catalase se manifeste par la production des bulles d'oxygène immédiat, après l'ajout d'une goutte de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ a 10 volumes) à une colonie prélevée à partir du milieu solide sur une lame.(Pierre-Yves Guillaume ,2017)

4.3.2 Test d'oxydase

C'est un test est de détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries qui produisent cette enzyme. A l'aide d'une pincettes, un disque d'oxydase est placé sur une lame, puis une colonie bien isolée et représentative de la culture fraîche à tester est prélevé et frottée doucement sur le disque préalablement imprégné dans de l'eau distillé. L'apparition d'une coloration bleu foncé à violette dans un délai de 15 secondes témoigne une réaction positive. (Macfaddin, J.1979)

4.3.3 Détermination du type respiratoire

Pour mettre en évidence le type respiratoire des souches bactériennes isolées sélectionnées et productrices des protéases, un tube contenant la gélose viande foie est chauffé pendant 15 minutes dans un bain Marie pour chasser les gaz et particulièrement l'oxygène dissous dans le milieu (régénération du milieu). Une fois le milieu est refroidi à environ 44 °C, les cultures bactériennes sont ensemencées en faisant des spires de bas en haut, ensuite les tubes sont refroidi immédiatement sous l'eau du robinet. Ces derniers sont incubés 24 à 48 heures à une température de 30C° (Prescott ,2002) .

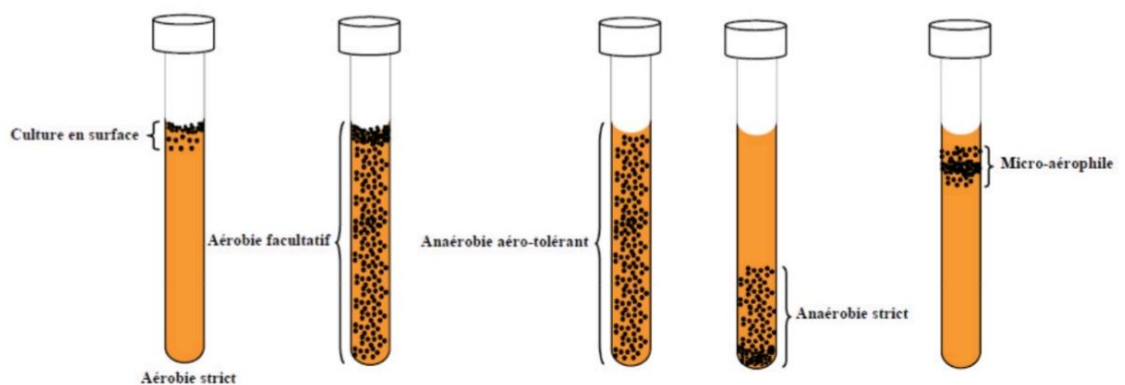


Figure11 : détermination du type respiratoire

5. Le screening secondaire des souches isolées sélectionnées productrices de protéases

Le screening secondaire des souches isolées, est effectué par mesure des diamètres de la zone d'hydrolyse formée autour des colonies sur milieu de culture solide (Kunitz, 1947).

5.1 Mesure de la zone d'hydrolyse sur milieu de culture solide

L'étude du pouvoir protéolytique des souches isolées et sélectionnées est réalisée sur milieu gélosé TGEA additionnées au lait écrémé à 1%. Le milieu est ensemencé en spot par des colonies jeunes des souches isolées et incubé ensuite pendant 24 h à 48 h à 30°C. L'index de l'activité protéolytique est déterminé par mesure du diamètre des zones d'hydrolyse formées autour de la colonie ensemencée en utilisant l'équation montrée ci-dessous (Facklam ,1989).

$$\text{L'index de l'activité protéolytique} = \frac{D(\text{zone}) - D(\text{colonie})}{D(\text{zone})}$$

D=diamètre

Les souches montrant des zones d'hydrolyse maximales sont sélectionnées pour la suite des études.

6. Evaluation de l'activité protéolytique des souches isolées par variation des paramètres de croissance

Cette étude consiste à varier les paramètres de croissance afin de contrôler la production de protéase chez les souches protéolytiques.

6.1 L'étude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique des souches isolées productrices de protéases

L'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique des souches isolées et sélectionnées a été étudié. Le milieu de culture TGEA additionné au lait écrémé à 1% (pH 6.2) estensemencé par la réalisation d'un spot au centre de la boîte de Pétri par des colonies jeunes des souches isolées productrices des protéases et incubé à 30°C. La mesure de l'activité protéolytique est effectuée à des intervalles de temps variés (18, 24, 48, 72, 96 et 120 heures) en utilisant l'équation de l'index de l'activité protéolytique.

6.2 L'étude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique des souches isolées productrices de protéases

L'influence du pH sur l'activité protéolytique des souches isolées et sélectionnées est mise en évidence dans le milieu gélosé TGEA additionné de 1% de lait écrémé à différentes valeurs de pH (4, 5, 7 et 9). Les souches sont inoculées en spot dans le centre de la boîte Pétri et ces dernières sont incubées à 30°C pendant 48h. La zone d'hydrolyse est mesurée et l'index de l'activité protéolytique à différents pH est déduit.

6.3 L'étude de l'effet de la température sur l'activité protéolytique des souches isolées productrices de protéases

L'effet de la température sur l'activité protéolytique des souches isolées productrices des protéases est déterminé par ensemencement en spot sur milieu gélosé TGEA additionné de 1% de lait écrémé. Les boîtes Pétri sont incubées pendant 48h à différentes températures (23, 37 et 42°C) et l'indice de l'activité protéolytique est calculé.

CHAPITRE 4

Résultats

Résultats

1. Le screening primaire

L'isolement des souches bactériennes était effectué à partir de 3 échantillons des sols riches en déchets protéiques dans la région de Tiaret (laiterie, abattoir et station d'épuration des eaux usées). Le screening primaire des bactéries sur gélose TGEA additionné au lait écrémé a permis d'isoler 6 souches productrices de protéase.

Une réaction positive se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour des colonies bactériennes sous forme d'un halo (**Facklam, 2005**). Les souches sélectionnées qui produisent la protéase sont purifiées par des repiquages successifs sur gélose nutritive et ont montrée après culture des propriétés morphologiques et biochimiques différentes (**Figures 11, 12 et 13**).



Figure 11: Illustration de la zone d'hydrolyse après incubation de 48heures.

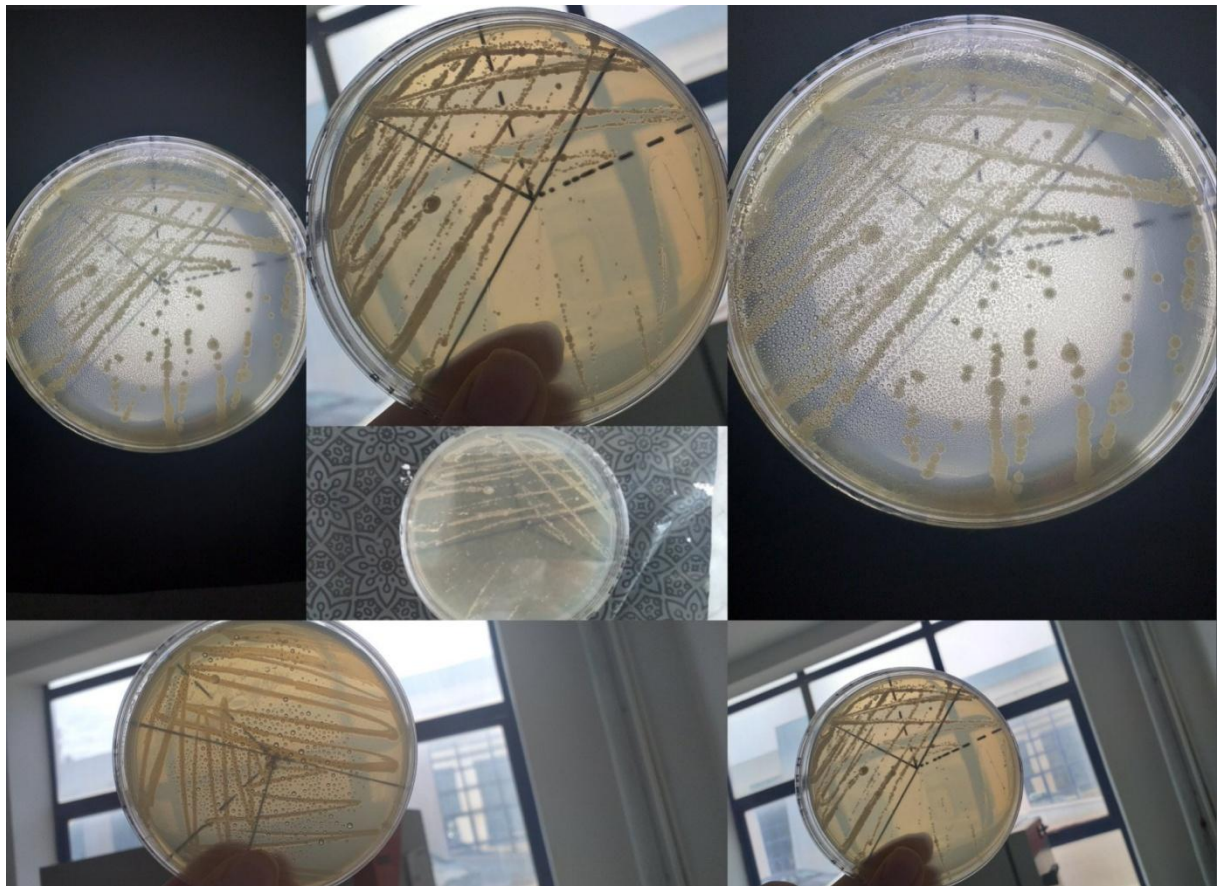


Figure12 : Aspect macroscopique des souches isolées, sélectionnées productrices de protéase.

2. L'identification phénotypique des souches isolées productrices des protéases

2.2 Caractères cultureux et biochimiques de la souche GPL-3

2.1.1. Aspect cultural : les colonies jeunes de 18 h de cultures de la souche isolée GPL-3 paraissaient blanchâtre et bombés, avec une texture visqueuse et des bords réguliers sur le milieu TGEA additionné de 10 % de lait écrémé.

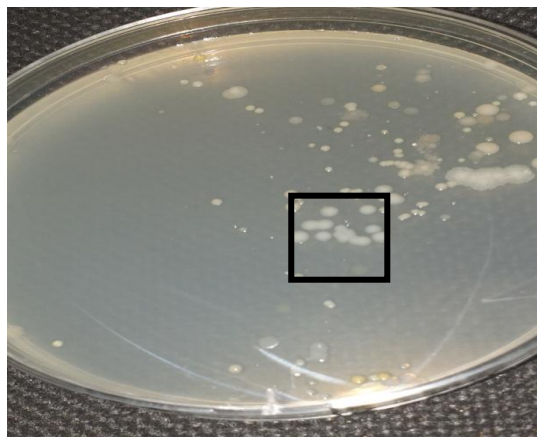


Figure 13 : Aspect macroscopique des souches après incubation sur milieu TGEA après 48heures **GPL-3.**

2.1.2 .Coloration de gram : l'observation microscopique (grossissement $\times 100$) après coloration de Gram de la souche GPL-3 effectuée à partir des colonies jeunes a montré des bacilles de couleur violette (Gram positif) regroupés en chainettes (**Figure 14**).

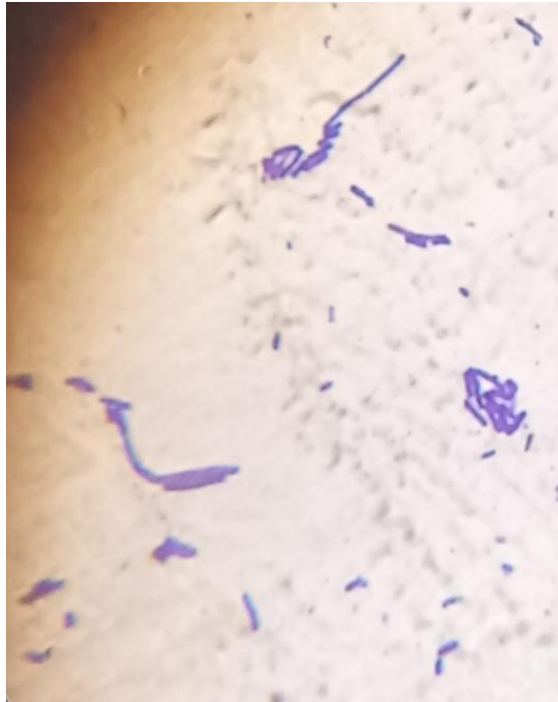


Figure14 : Coloration de gram et observation microscopique des souches isolées à partir de l'échantillon **GPL-3** (grossissement $\times 100$).

2.1.3. Catalase : La constatation d'un dégagement gazeux chez les candidats est la preuve de la production de catalase, la souche GPL-3 a donné une réaction de catalase positive (+) traduite par la formation des bulles d'oxygène sur la lame.



Figure15 : Test catalase effectué sur la souche **GPL-3**.

2.1.4. Oxydase : le résultat du test de la mise en évidence de l'oxydase a montré que l'isolat GPL-3 est oxydase négatif (-) due à la non coloration du disque d'oxydase.

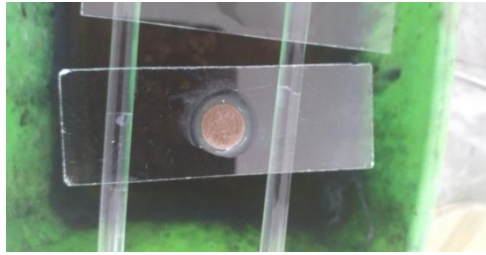


Figure16 : Résultat du test oxydase effectué sur la souche **GPL-3**.

2.1.5. Type respiratoire : la mise en évidence du test respiratoire de la souche GPL-3 est réalisée sur le milieu viande-foie, une diffusion des bactéries sur la surface du milieu confirme son type respiratoire aérobic strict (**figure 17**).



Figure17 : Illustration du test effectué pour voir le type de respiration de la souche **GPL-3**.

2.1.6. Mobilité : l'observation microscopique à l'état frais de la souche GPL-3 a montré que la souche est mobile (Mobilité +).

2.2. Caractères culturels et biochimiques de la souche GPL-5

2.2.1. Aspect culturel : la souche GPL-5 a donné des colonies visqueuses, opaques, légèrement bombées avec des bords réguliers après culture sur le milieu TGEA additionné de 1% de lait écrémé (**figure 18**).

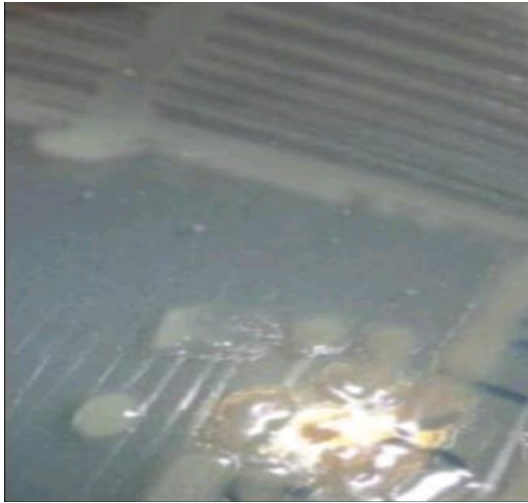


Figure 18 : Aspect macroscopique des souches après incubation sur milieu TGEA pendant 48heures **GPL-5**.

2.2.2. Coloration de Gram : la coloration effectuée sur des cultures jeunes de la souche GPL-5 a révélé des bâtonnets à Gram positifs regroupés en amas sous grossissement $\times 100$.

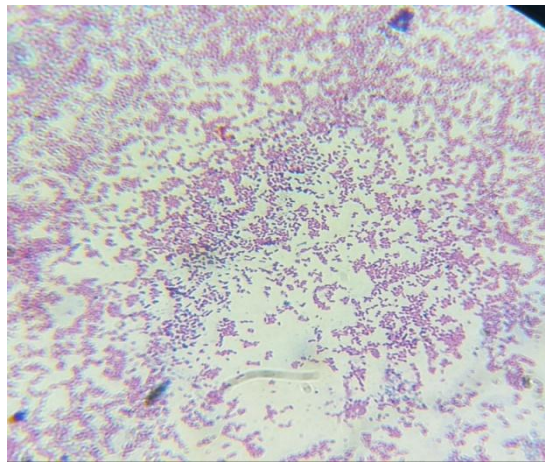


Figure19 : Coloration de gram et observation microscopique des souches isolées a partir de l'échantillon **GPL-5** (grossissement $\times 100$).

2.2.3. Catalase : la mise en évidence du catalase, une enzyme qui dégrade le composé cytotoxique (H_2O_2), a montré que la souche GPL-5 possède cette enzyme confirmé par le dégagement des bulles sur la lame (**figure 20**).



Figure20 : Test catalase effectué sur la souche **GPL-5**.

2.2.4. Oxydase : la réaction d'oxydase est positive pour la souche GPL-5 traduite par le changement du couleur du disque d'oxydase (**Figure 21**).

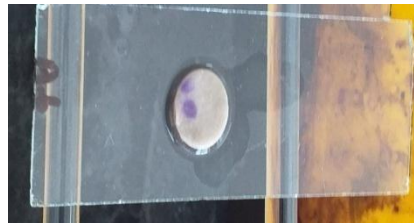


Figure 21 : Résultat du test oxydase effectué sur la souche **GPL-5**.

2.2.5. Type respiratoire : la détermination du type respiratoire de la souche GPL-5 effectuée sur la gélose viande-fois a montré son type Aérobie stricte traduit par la diffusion de la souche sur la surface du milieu.



Figure22 : Illustration du test effectué pour voir le type de respiration de la souche **GPL-5**.

2.2.6. Mobilité : l'observation microscopique à l'état frais de la souche GPL-5 montre que celle-ci est mobile.

2.3. Caractères cultureux et biochimiques de la souche ABT -6

2.3.1. Aspect cultural : les colonies de l'isolat ABT-6 apparaissent visqueuses, légèrement bombées, avec une apparence opaque, la surface est lisse et les bords sont réguliers sur un milieu TGEA.



Figure 23 : Aspect macroscopique des souches **ABT -6** après incubation sur milieu TGEA

2.3.2. Coloration de Gram : le résultat de la coloration de Gram et l'observation microscopique avec un grossissement de ($G \times 100$) a montré que les cellules de la souche **ABT -6** sont des bacilles Gram négatif.

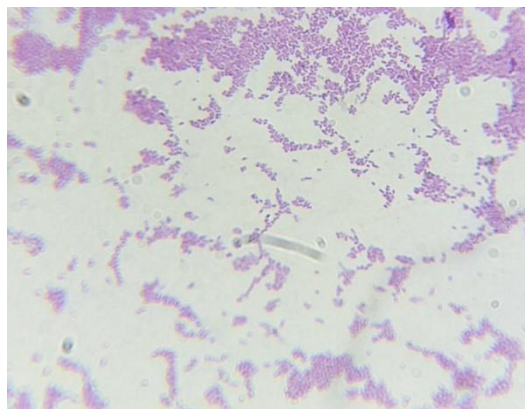


Figure 24 : Coloration de gram et observation microscopique des souches isolées à partir de l'échantillon **ABT-6** (grossissement $\times 100$).

2.3.3. Catalase : la formation d'une effervescence sur la lame après ajout de l'eau oxygénée sur les colonies de la souche **ABT-6** exprime une réaction positive de catalase.



Figure 25 : Test catalase effectué sur la souche **ABT -6**.

2.3.4. Oxydase : le changement de couleur du disque d'oxydase exprime une réaction Positif + de la souche ABT-6.



Figure 26 : Résultat du test oxydase effectué sur la souche **ABT -6**.

2.3.5. Type respiratoire : le résultat de la mise en évidence du type respiratoire a montré que les colonies de la souche ABT-6 cultivées sur gélose viande-foie sont diffusées en haut du tube, ainsi elles sont des Aérobies strictes.



Figure 27 : Illustration du test effectué pour voir le type de respiration de la souche **ABT -6**.

2.3.6. Mobilité : l'observation au microscope à l'état frais de la souche ABT-6 a révélé que cette souche est Mobile +.

2.4. Caractères cultureux et biochimiques effectués sur la souche GPL-6

2.4.1. Aspect cultural : Les colonies de la souche GPL-6 paraissent sur un milieu TGEA blanchâtres bombés, une texture visqueuse, avec un diamètre de colonie de 5 mm, de consistance crémeuse, translucide à opaque.

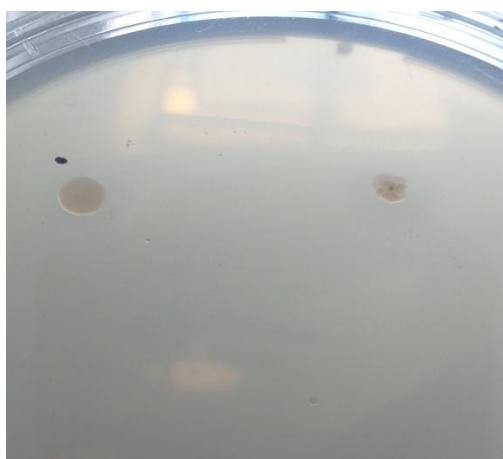


Figure 28 : Aspect macroscopique des souches après incubation sur milieu TGEA pendant 48heures **GPL-6**.

2.4.2. Coloration de Gram : L'observation microscopique après coloration de Gram des cellules de la souche GPL-6 a montré des bacilles violette (Gram +) regroupés en chaînes sous grossissement $\times 100$.



Figure29 : Coloration de gram et observation microscopique de la souche isolée à partir de l'échantillon **GPL-6** (grossissement $\times 100$).

2.4.3. Catalase : l'apparition de bulle sur la lame signifie que la souche GPL-6 possède une catalase (catalase +).



Figure 30 : Résultat du test catalase effectué sur la souche **GPL-6**.

2.4.4. Oxydase : Le résultat du test de l'oxydase chez la souche GPL-6 n'a révélé aucun changement de couleur (oxydase négatif).



Figure31 : Résultat du test oxydase effectué sur la souche **GPL-6**.

2.4.5. Type respiratoire : La souche GPL-6 a donné une croissance en surface seulement sur le milieu viande-foie ce qui confirme son type respiratoire Aérobie strict.



Figure32 : Illustration du test effectué pour voir le type de respiration de la souche **GPL-6**.

2.4.6. Mobilité : l'observation au microscope à l'état frais indique que la souche GPL-6 est Mobile +.

2.5. Caractères cultureux et biochimiques effectués sur la souche ABT-5

2.5.1. Aspect cultural : les colonies de la souche ABT-5 ont une apparence blanchâtre, visqueuse, bombé, elles sont translucide a opaque. Cette souche est sporulée.

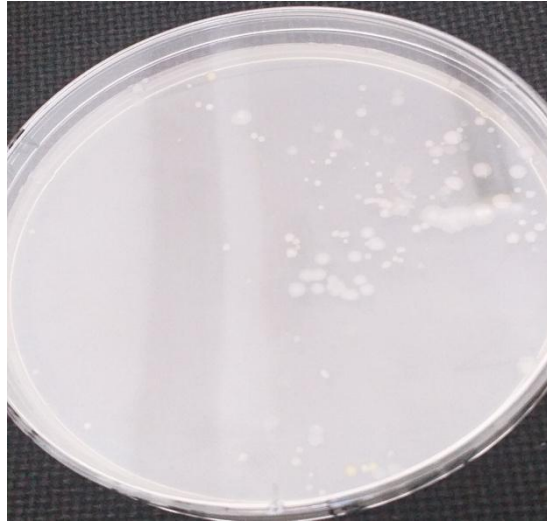


Figure 33 : Aspect macroscopique des souches après incubation sur milieu TGEA pendant 48heures **ABT-5**.

2.5.2. Coloration de Gram : les cellules de la souche ABT-5 se présentent sous forme de bâtonnets violets après coloration de Gram sans un mode de regroupement particulier.

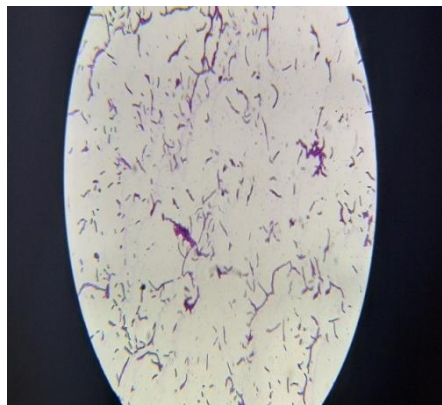


Figure 34 : Coloration de gram et observation microscopique de la souche isolée à partir de l'échantillon **ABT-5** (grossissement $\times 100$).

2.5.3. Catalase : le résultat obtenu du test de catalase pour la souche ABT-5 est positif manifesté par le dégagement des bulles sur la lame après ajout de l'eau oxygénée.

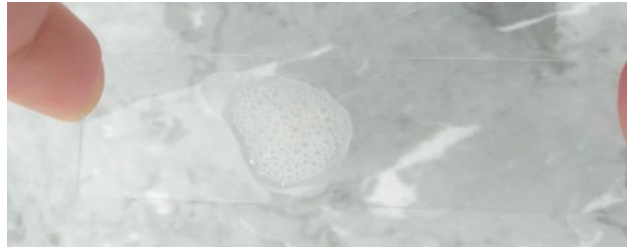


Figure 35 : Résultat du test catalase effectué sur la souche **ABT-5**.

2.5.4. Oxydase : le résultat du test oxydase ne donne aucun changement du couleur du disque ainsi, la réaction oxydase pour la souche ABT-5 est Négatif –.



Figure36 : Résultat du test oxydase effectué sur la souche **ABT-5**.

2.5.5. Type respiratoire : les colonies de la souche ABT-5 cultivée dans un milieu viande-foie sont diffusées en haut du tube, ainsi elles sont des Aérobies strictes.

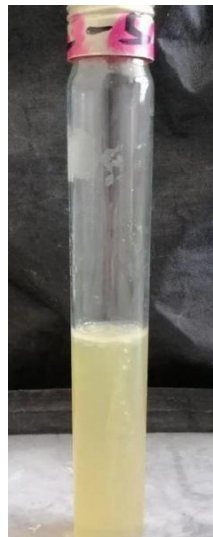


Figure37 : Illustration du test effectué pour voir le type de respiration de la souche **ABT-5**.

2.5.6. Mobilité : l'observation au microscope à l'état frais a révélé que la souche ABT-5 est Mobile +.

2.6. Caractères culturales et biochimiques de la souche ONA-5

2.6.1. Aspect cultural : Les colonies jeunes de la souche ONA-5 apparaissent blanchâtres, visqueuses, bombés, opaque, les bords son réguliers et le contour lisse sur le milieu TGEA. Cette souche est sporulée.

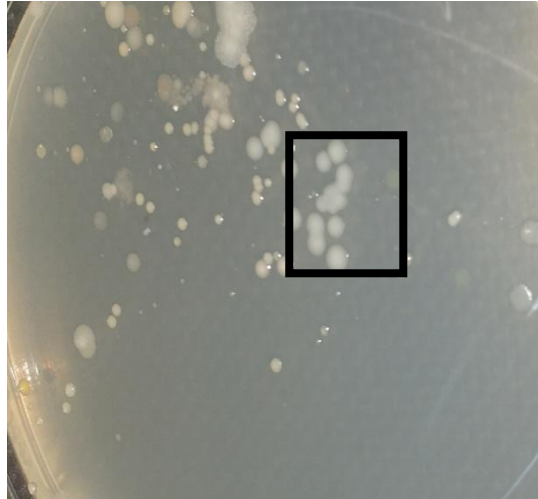


Figure38 : Aspect macroscopique des souches après incubation sur milieu TGEA pendant 48heures **ONA -5**.

2.6.2. Coloration de Gram : Les cellules de la souche ONA-5 apparaissent violettes sous microscope après coloration de Gram, sous forme de bâtonnets légèrement enflés à l'extrémité sans un mode de regroupement particulier.

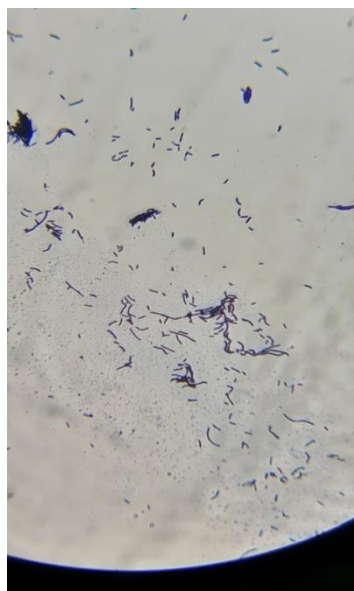


Figure39 : Coloration de gram et observation microscopique des souches isolées à partir de l'échantillon **ONA-5** (grossissement $\times 100$).

2.6.3. Catalase : Le résultat du test catalase a montré la formation de bulle dans la lame qui est significatif d'une réaction Positive pour la souche ONA-5.



Figure40 : Test catalase effectué sur la souche **ONA -5**.

2.6.4. Oxydase : Aucun changement de couleur n'apparaît sur le disque d'oxydase imprégné par les colonies de la souche ONA-5 ce qui en résulte que la souche ne possède pas l'enzyme oxydase (-).

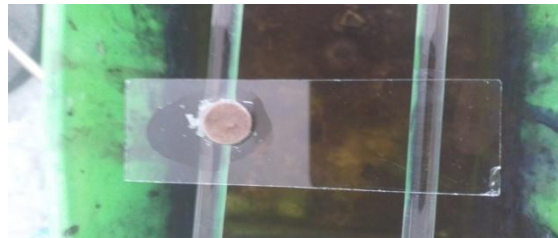


Figure41 : Résultat du test oxydase effectué sur la souche **ONA -5**.

2.6.5. Type respiratoire : les colonies de la souche ONA-5 cultivée dans un milieu viande foie ont donné une culture en surface de tube, ainsi elles sont des Aérobie strictes.

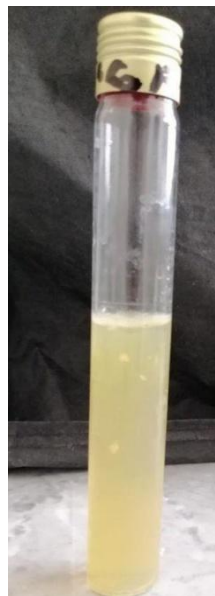


Figure42 : Illustration du test effectué pour voir le type de respiration de la souche **ONA -5**.

2.6.6. Mobilité : l'observation au microscope à l'état frais de la souche ONA-5 a révélé que cette souche est Mobile +.

3. Le screening secondaire

Le screening secondaire des bactéries productrices de protéase effectué par mesure des diamètres de la zone d'hydrolyse formés autour des colonies sur milieu de culture solide (TGEA additionné de 1% de lait écrémé) a permis d'isolé 2 souches dotées d'une bonne activité protéolytique parmi les 6 souches testées (**tableau 3**)

Les 2 souches retenues comme étant les plus performantes sont la souche GPL-3 et la souche ABT-6 qui ont manifesté des valeurs maximales des index protéolytique de 1.17 et 1.33 respectivement. Les autres souches (GPL5, GPL-6, ABT-5 et ONA-5) présentaient un pouvoir protéolytique modéré (avec des index d'activité protéolytique de 0.33, 0.2, 2.2, 0.54 respectivement).

Tableau 3 : Les index de l'activité protéolytique des souches productrices de protéase.

Souches	Index de l'activité protéolytique
GPL -3	1,17
GPL-5	0,33
GPL-6	0,2
ABT-5	0,2
ABT-6	1,33
ONA -5	0,54

4. Etude de l'activité protéolytique après modification des paramètres de croissance (Temps, température et pH)

Afin de pouvoir établir les conditions de croissance optimales pour atteindre une activité protéolytique maximale chez les souches productrices des protéases les plus performantes (GPL-3 et ABT-6), les paramètres suivants ont été variés : le temps d'incubation, la température d'incubation et le pH du milieu de culture. Les index de l'activité protéolytique sont ainsi calculés pour chaque paramètre varié et les résultats obtenus sont représenté dans les figures ci-dessous :

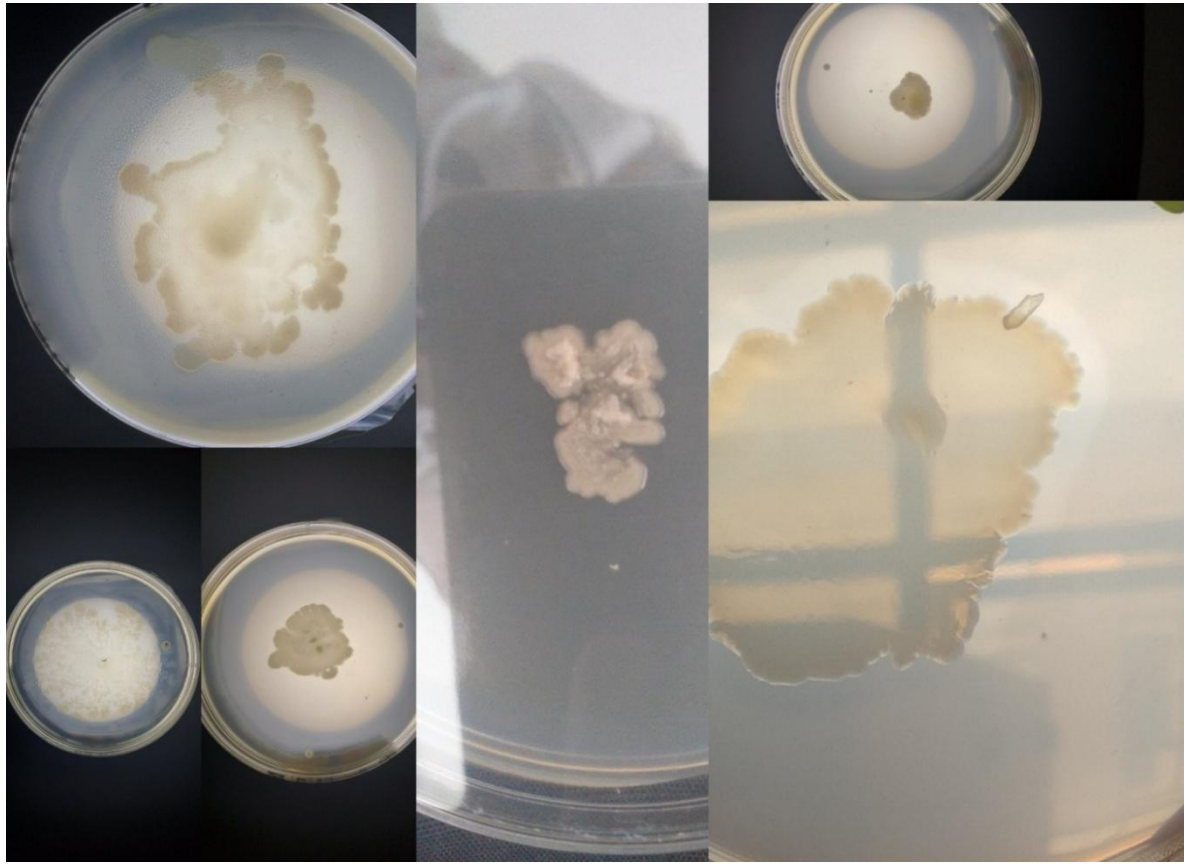


Figure 43 : Les différents résultats obtenus après variation des paramètres de croissance (pH, temps d'incubation et température)

4.1 Etude de l'effet de la période d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches GPL-3 et ABT-6

L'effet de la période d'incubation sur l'activité protéolytique chez les 2 souches GPL-3 et ABT-6 a été mise en évidence par inoculation de ces dernières dans le milieu de culture TGEA additionné au lait écrémé à 1% (pH 6.2), les boîtes étaient incubées à 30°C, l'index de l'activité protéolytique est calculé après des périodes d'incubation de 18, 24, 48, 72, 96 et 120 heures. Les résultats obtenus (**Figure 44**) ont montré que la souche GPL-3 a donné un maximum de pouvoir protéolytique après 120 heures d'incubation avec un index protéolytique de 1.6 ; alors que la souche ABT-6 a manifesté un pouvoir protéolytique maximale (1.3) après la même période d'incubation (120 heures). Ces résultats montrent que l'activité protéolytique augmente au fur et à mesure du temps d'incubation.

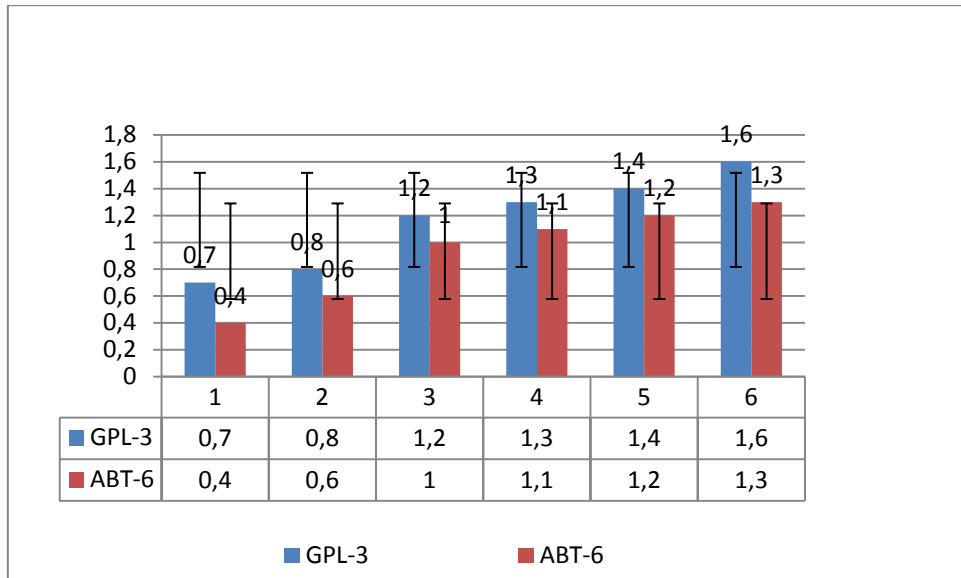


Figure44 : Étude de l'effet de la durée d'incubation sur les souches productrices de protéase.

4.2 Effet du pH sur l'activité protéolytique chez les souches GPL-3 et ABT-6

Comme le pH joue un rôle important dans tous les processus biologiques, également la production des protéases, cette dernière était testée chez les souches GPL-3 et ABT-6 à des valeurs de (4, 5, 7 et 9) de pH après 24 h et 48 h d'incubation à 30°C.

Les résultats obtenus montrent que la production des protéases est arrêtée (index de 0) à un pH de 4 chez les 2 souches GPL-3 et ABT-6 après 24h et 48h d'incubation. L'activité protéolytique était maximale chez les 2 souches GPL-3 et ABT-6 (1 et 0.3 respectivement après 24h d'incubation, 1.2 et 0.8 après 48h d'incubation) dans un pH de 7.5 qui semble une valeur optimale pour la production des protéases.

A une valeur de pH de 9 l'activité protéolytique était arrêtée chez la souche GPL-3 alors que la souche ABT-6 a manifesté une activité protéolytique médiocre de 0.2 (**Figure 46 et 47**).

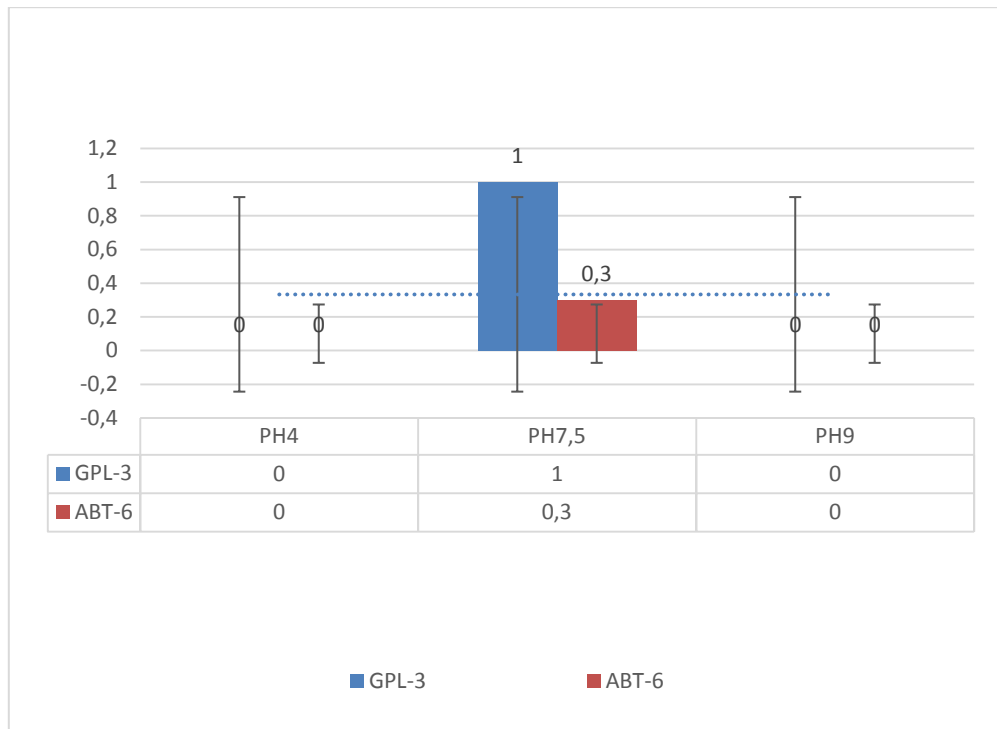


Figure46 : Étude de l'effet de variation du pH sur les souches productrices de protéase pendant 24heures.

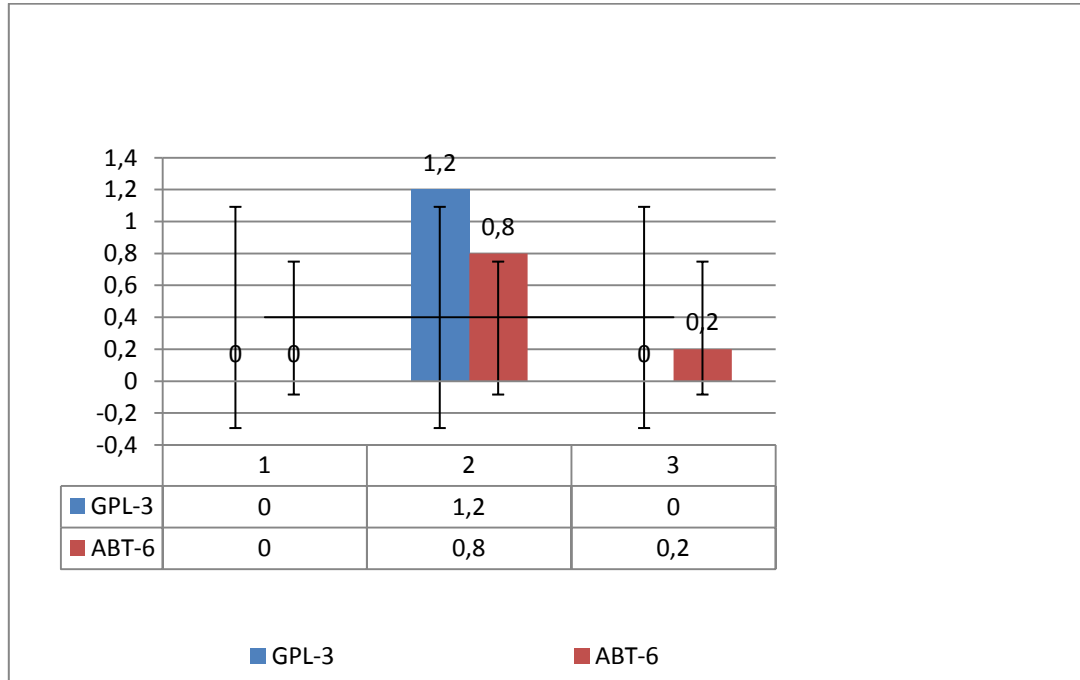


Figure47 : Étude de l'effet de variation du pH sur les souches productrices de protéase pendant 48heures.

4.3 Etude de l'effet de la température sur l'activité protéolytique chez les souches GPL-3 et ABT-6

L'effet de la température d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches GPL-3 et ABT-6 a été étudié par ensemencement en spot sur milieu gélosé TGEA additionné de 1% de lait écrémé. Les boîtes de Pétri étaient incubées en premier lieu pendant 24h à différentes températures : 23, 37 et 42°C. Les indices de l'activité protéolytique ont été déterminés, la souche GPL-3 a montré une activité protéolytique maximale (0.5) à une température de 23°C avec une légère diminution de cette valeur à 37°C (0.4). Par ailleurs, la souche ABT-6 a manifesté une activité protéolytique médiocre et constante dans les 2 valeurs de température (23 et 37°C). L'activité protéolytique est négativement influencée par l'augmentation de la température à une valeur de 42°C ou la production des protéases a diminué chez les 2 souches testées (**figure 48**).

L'activité protéolytique de la souche GPL-3 semble a diminué après 48h d'incubation dans les 2 valeurs de températures (23 et 37°) avec des index de 0.2 et 0.3 respectivement. Alors que la souche ABT-6 a manifesté une production des protéases maximale après 48h d'incubation à 23°C (0.6) avec une légère diminution à 37°C (0.4). L'activité protéolytique reste très faible pour les 2 souches à 42°C après 24h d'incubation (**figure 49**).

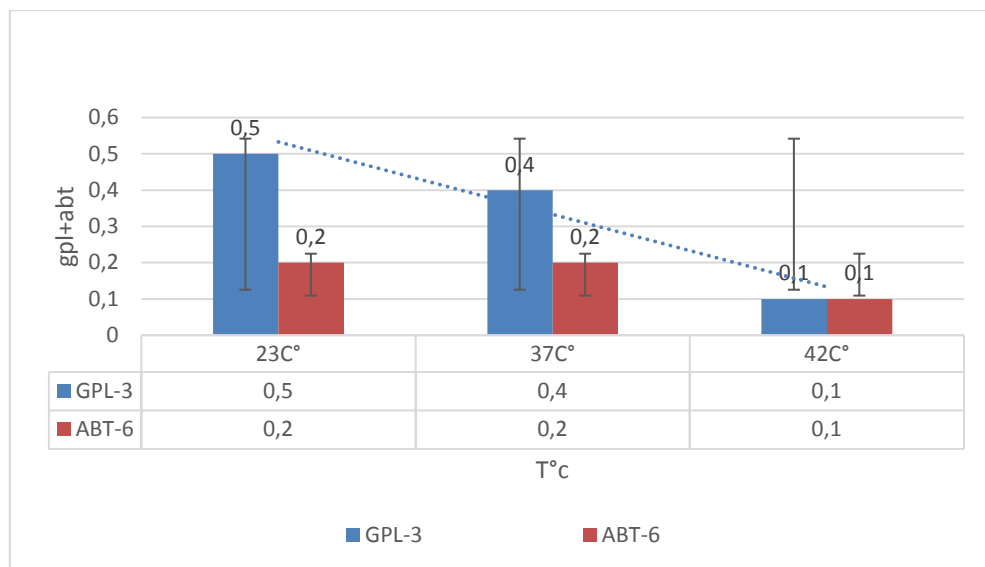


Figure48 : Étude de l'effet de variation de température sur les souches productrices de protéase pendant 24heures.

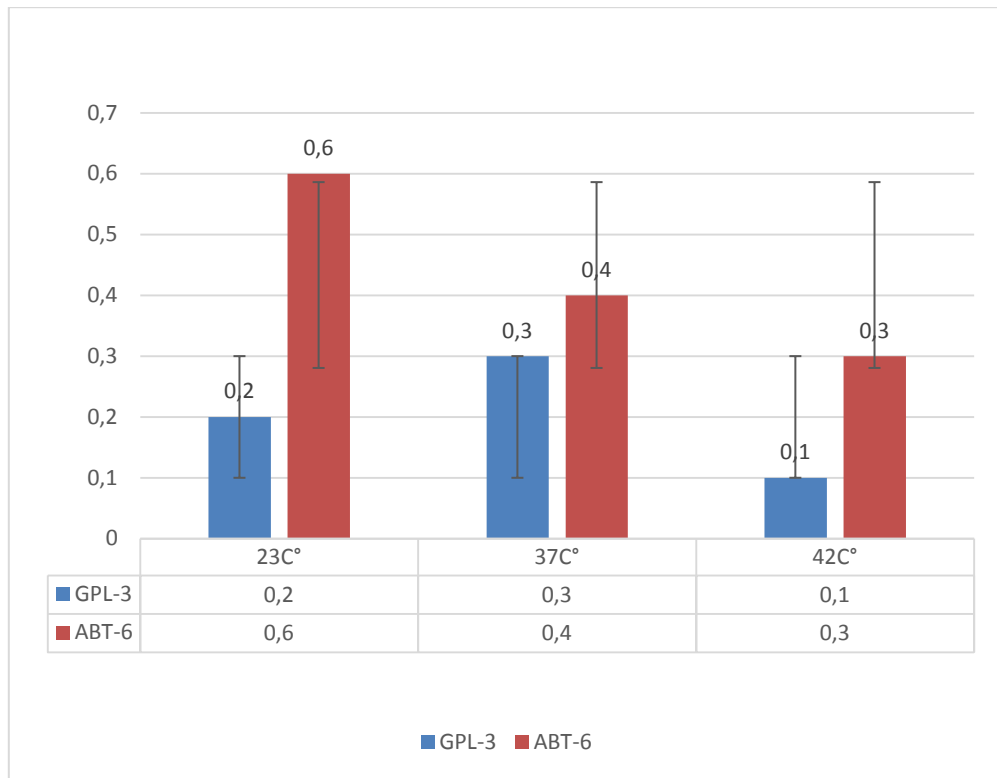


Figure 49 : Étude de l’effet de variation de température sur les souches productrices de protéase pendant 48heures.

Discussions générale

Discussions générale

L'objectif de cette étude est l'isolement des bactéries productrices de protéase à partir de sol riche en protéines (station d'épuration des eaux, abattoir et laiterie) dans la région de Tiaret.

Les stratégies d'isolement ont été effectuées par différentes manières afin de s'orienter vers des bactéries productrices de protéase de différents genres par la variation de méthodes appliquées, comme le choc thermique effectués pour la stimulation du développement de la forme sporulée (Lynn *et al*, 1999). Les milieux de culture TGEA et gélose nutritif additionné au lait écrémé à 1% ont été utilisés pour isoler les bactéries productrices de protéase (Patel, 1985).

Le screening primaire effectué selon la méthode décrite par (Facklam *et al* 1989, Denizci *et al*, 2008, Mukhtar et Haq 2008, Oljajuyible et Ajele 2008, Chekireb *et al* 2009, Kalaiarasi et Sunita 2009), à partir de différents sols riches en résidus protéiques a permis d'incuber 18 boîtes pétries et de ces 18 boîtes seulement 6 souches sont dotées d'un pouvoir protéolytique et ces souches ont été isolées et purifiées plusieurs fois.

L'étude phénotypique et l'identification préliminaire du genre basée essentiellement sur la détermination des caractéristiques morphologiques, la coloration de Gram, la présence de catalase et d'oxydase, l'étude du type respiratoire, la mobilité et la sporulation ; ils ont révélés l'appartenance des souches isolées au genre *Bacillus* (Emanuel *et al*, 2009), et *Pseudomonas* (Palleroni *et al*, 2010).

Les souches pures sont conservées à courte durée dans une gélose inclinée et maintenues à une température de 4°C et repiquées chaque 4 semaines (Badiset *et al*, 2005 ; Gallagher et Willey, 2008).

Le screening secondaire des souches productrices de protéase en spot dans le milieu de culture TGEA additionnée au lait écrémé a donné des résultats remarquables chez les 2 souches (GPL-3 et ABT-6) par la formation de zones d'hydrolyse d'un diamètre de 1,4 cm et 1,5 cm respectivement.

Selon des études faites par Sokol et ses collaborateurs (1979) ; Sharipova et ses collaborateurs (2000) ils ont considéré que les souches avec une excellente activité protéolytique se manifestent avec une zone d'hydrolyse allant de 1 jusqu'à 2,8 cm.

La comparaison entre les résultats trouvés et les résultats des études menées ont montrés que les souches sont performantes et que le milieu est adéquat, puisque le diamètre de la zone d'hydrolyse des souches protéolytiques est dans les normes de la littérature des chercheurs.

Pour pousser les recherches et pour voir la performance de ces souches productrices de protéase, les paramètres de croissance des souches ont été modifiés (le temps d'incubation, la température et le pH), afin d'évaluer leur activité protéolytique en mesurant la zone d'hydrolyse après chaque modification ; tout d'abord l'effet de la durée d'incubation a été étudié d'après les résultats plus le temps d'incubation est long plus la zone s'agrandit jusqu'à ce qu'elle se stabilise car le milieu est non renouvelé.

Ensuite la 2ème modification effectuée a été sur la température après la variation de la température les résultats ont montrés que les souches productrices de protéase avez des températures optimales car lorsque la température augmente ou baisse la zone d'hydrolyse a varié en comparant avec les résultats trouvés dans la température optimale.

Le pH avait un effet majeur sur la production des protéases, les résultats obtenus ont montré que l'activité protéolytique maximale était à une valeur de 7, aucune croissance des souches productrice de protéase n'est observée à des valeur de 4 et 9 de pH ;on conclue que la valeur du pH du milieu de culture a affecté considérablement les mécanismes de la production des protéases chez les bactéries.

CONCLUSION

CONCLUSION

Cet étude s'inscrit dans une approche qui consiste à l'utilisation des enzymes microbienne afin de : (i) minimiser l'exploitation des ressources renouvelables et non renouvelables; (ii) à réduire l'utilisation des produits chimiques en favorisant l'émergence d'une nouvelle industrie de produits biologiques économiquement plus abordables, basée sur des matériaux économiquement viables, le tout en respect avec le développement durable(Drouin ,2005) .

Le but principal de cette étude est d'isoler et de caractériser des bactéries ayant la capacité de produire des protéases.

Le screening primaire a permis d'isoler 6 souches protéolytiques appartenant à différents genres et lors du criblage secondaire, seulement 2 souches ont présenté une excellente activité protéolytique.

Afin d'étudier cet activité protéolytique, les paramètres de croissance ont été modifiés (température, durée d'incubation et enfin le pH) et la production des protéases était évaluée.

Les travaux réalisés au cours de cette étude consistent à caractériser les bactéries productrices de protéase ; cependant, il reste plusieurs travaux à mener afin de répondre aux questions soulevées lors de ces travaux et afin de poursuivre l'optimisation du procédé. Les recommandations pour des travaux ultérieurs sont les suivantes :

- Lors des prochains travaux, il serait souhaitable de mesurer la quantité de protéases produites en plus de l'activité protéolytique.
- L'identification biochimique et moléculaire des souches productrices des protéases les plus performantes.
- Au cours de ce travail, seulement les paramètres (pH, température et durée d'incubation) ont été étudiés, Il serait souhaitable d'étudier de façon approfondie d'autres paramètres tel que l'oxydation, l'effet de l'ajout de certaines sources.
- Il serait intéressant d'ajouter des déchets municipaux ou agricoles riches en azote ou en carbone afin d'améliorer la composition du milieu et pourquoi pas avoir un résultat beaucoup plus intéressant
- L'amélioration de la production de protéase par des méthodes du génie génétique

Références bibliographiques

Référence bibliographique

Akkermans p (1996).Reclassification of *Pseudomonas syringaepvavellanae* as *Pseudomonas avellanae* (spec .nov) , the bacteriumcausingcanker of hazelnut (*Corylusavellanae* L.) .Syst .Apple .Microbiol . 19 :598-595.

AlquatiC.,Gioia D. E. Santarossa G .Alberghi A. L. Fantucci P. Lotti M.(2002). The cold-active lipase molecularmodeling ,Eur . J.Biochem. 26 9 :3321-3328 .

BadisA ., Laouabdia sellami N. Guetarni D. Kihal M. OuzroutR, (2005) . Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales <Arabia et Kabyle >. Sciences & technologie ,23 :30-37.

Bergey D .H .Noel R. K ; John G. H;(1984) .Bergey'smanual of systematicbacteriologyBaltimore : Williams & Wilkins, 1246 p.

Bernard Breslow ,(1998),journal of chemicaleducation vol 75 ,6,750-718

Bouchez M, Blanchet D, Vandecasteele J.P. (1995) .An interfacial up takeme chanism for the 364 degradation of pyrene by a Rhodococcusstrain. Microbiology 143:1087-1093.

BoukhtachH ,(2018). Isolement et caractérisation des bactéries productrices de protéases à intérêt biotechnologique.

Chekireb D ., Tahar A .,Cochet N. (2009) . Acidprotease production by isolatedspecies of Penicillium .European Journal of ScientificResearch ,125-140.

Coultouly,(1991). Génie enzymatique.Masson Paris. Milan. Barcelona .pp143-145.

De Ley . De Smedt, (1975).Improvements of the membrane filtermethod for DNA:rRNAhybridization 41, pages287–307.

Denizci A .A. ,Kazen D. Abdeln E. C. A .,Erarslan A ; (2008). New lyisolated *Bacillus claisii* GMBAE / an alkaline protease peoducer capable to grow under highly alcaline conditions. Global Journal of Biotechnology&Biochemistry ,3(1) :42-46.

Doi ,(1972) . Role of proteases in sporulation. Dans: Molecularmicrobiology, KWAPINSKI J. B. G., Wiley, New-York, États-Unis, pp. 1-20.

Emanuel G., Lorrence H G(2009). Practicalhanbook of microbiology . CRC press . USA ,13 :978-8493 .

Facklam R., Hollis D., Collins M.D.(1989). identification of gram-positive coccal and coccobacillaryvancomycin-resistantbacteria. J. Clin .Microbiol.,27 :724-730.

Fahmy F. ; Flossdorf J. ; Claus D. (1985). The DNA composition of the type strains of the genus*Bacillus* .Syst .App .Microbiol . ; 6 :60-65.

Fogarty W.M. Kelly C.T., (1990).Microbial enzymes and biotechnology, 2e Édition. Elsevier Science Publishing, New-York, États-Unis, 472 pages.

Fritze D , (2004) . Taxonomy and systematics of the aerobic endospore forming bacteria : *Bacillus* and related genera . in Bacterial Spore Formers : Probiotics and Emerging Application ,Eds . E .Ricca ,A .O.Henriques , and S.M. Cutting . Norfolk, U.K : Horizon Bioscience, 17-34.

Gaignard, Luisetti, (1993).*Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, glaçogène et pathogène. Agronomie. 13 : 333–370.

Gallagher S.Willey E. (2008). Current Protocols Essential Laboratory techniques .New York, John Wiley&Sons, inc , 978 :470 .

Gordon R. E. ; Hayens W .C. Pang C. H. N. (1973) .The genus *Bacillus* . in *Bacillus* Edited by Colin R Harwood .New-york& London .plenum Press , 293-320 .

Gordon Y .J . ; Romanowski E .G . ;Mecdermot A. M. (2005) .A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs . Curr .Eye .Res .Jul . ; 30(7) :505-15.

Hmidet N. ; El Hadj A. ; N. ; Haddar A. ; Kanoun S. ; Alya S. ; Nasri M (2009).Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis*.

NH1 : Characterization and potential application as detergent additive. Biochemical Engineering Journal, 47 :71-79 .

Jaspard E,(2013).role of protein solvent interaction in refolding : effects of cosolvent additives on the renaturation of porcine pancreatic elastase at various pHs.

Kalaiarasi K., Sunita P. U (2009) . Optimization of alkaline protease production from *Pseudomonas fluorescens* isolated from meat waste contaminated soil .African Journal of Biotechnology , 8(24) :7035-7041 .

Key L., Moseley M.H., Anderson R.G., O'connor R.J. et Wildi B.S., (1972). Production and isolation of microbial proteases. Biotechnology and Bioengineering. Symposium 3: 63-92.

Kudry V.A. et Simoneko I.A.,(1994). Alkaline serine protease and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. Applied Microbiology and Biotechnology 41: 505-509.

Kumar C.G. et Takagi H., (1999).Microbial alkaline proteases: From a bio industrial view point. Biotechnology Advances 17: 561-594.

Kumar G. et Parrack P., (2003). Arrowroot (*Marantha arundinacea*) starch as a new low-cost substrate for alkaline protease production. World Journal of Microbiology and Biotechnology 19: 757- 762.

Kumar C.G. et Takagi H.,(1999).Microbialalkalineproteases: From a bioindustrialviewpoint. *BiotechnologyAdvances* 17: 561-594

Kunitz ;(1947) .CRYSTALLINE SOYBEAN TRYPSIN INHIBITOR : II. GENERAL PROPERTIES 30(4):291-310 .

Larbi D K ; (2015). Isolement et caractérisation des souches productrices de lipase.

Logan N .A . ; Berkeley R .C. W . (1984) . identification of *Bacillus* strains using API system *J .Gen .Microbiol . ;* 130 :1871- 1882 .

Lynn f ., jahir A. k., Rucjika P. (1999) . A study on partial purification and characterization of extracellularproteasesfrom*Bacillus subtilis*. *PelagiaresearchLibrary* , 2(3) :509-19.

Macffedin, J. F., (1979).Oxidase test, Biochemical test for Identification of MedicalBacteria, 154-162

Manaia and Moore, (2002).The IntegratedTaxonomic Information System *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52::2208.

Mathieu Drouin, (2005). Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat .

Meghdas I. MonzerH .Dabboussi F. Baida Daniell.(2004) . Taxonomie du gznre *Pseudomonas* rétrospective et actualité 27(3) :151-160.

Meunier, (1999). Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir des boues d'épuration municipales.

Mukhtar H. Haq I .(2008) . Production of alkaline protease by *Bacillus subtilis* and its application as a deplating agent in leatherprocessing .*Pak. J .Bot . ,* 40(4) :1673-1679.

Munsch P .AlatossavaT .(2002). Several*Pseudomonas* ,associatedwith the cultivatedmushrooms*Agricusbisporus* or *pleurotussp .,* are hemolytic .*Microbiol . Res .*157 :1-5

Nishimori E. Kita-Tsukamoto K. Akabayashi H.(2000). *Pseudomonas plecoglossicada* sp .Nov , the causative agent of bacterielhaemorrhagic ascites of ayu , *Plecoglossusaltivelis* .*Int .J.Syst .Evol.Microbiol .* 50 :83-89 .

Ole k. ;Borchet.T.V. ; fuglsang C .C. (2002).Inductrial enzymes applications current opinion in Biotechnology .

Oljajuyible F. M., Ajele J. O.(2008) . Someproperties of extracellul r proteasefrom *Bacillus licheniformis* Lbb1-11 isolatedfrom<iru> , a traditionallyfermentedAfricanlocustbean condiment , IDOSI Publications .

- Palleroni N.J.**(2005). Genus *Pseudomonas* ,in : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology .part B :the proteobacteria . Springer ,New York ,323-379 .
- Pandey G, Jain RK** (2002). Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 68:5789–5795.
- Patel P. R.** (1985). Enzyme isolation and purification In : *Biotechnology Applications and Research* .Technomis Publishing CO-Inc .USA,534-564.
- Peix , A., Ramirez-Bahena, MH. et Velazquez, E.** (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*. 9: 1132– 1147.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A.** (2002). *Microbiology Food and Industrial Microbiology*. 5th Edition, McGraw-Hill, Boston, 978-981.
- Prescott W ;. Sherwood W ;.**(1993). *Prescott's Microbiology*. huitième édition ; 113-114.
- RAO M.B., TANKSALE A.M., GHATGE M.S. et DESHPANDE V.V.,** (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (3): 597-625.
- Reddy S T Kumar N S Venkateswerlu G**(1998). Comparative analysis of intracellular proteases in sporulated *Bacillus thuringiensis* strains .*Biotechnology letters* ,20(3) : 279-281.
- Secades P .; Guijarro J.A .**(1999). Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production .*Applied and Environmental Microbiology* , 65 (9) : 3969-3975 .
- Sharipova M.R., Shakirov . E.V., Balaban N .P. Gabdrakhmanova L. A .Shilova M. A .Rudenskaya G. N. Leshchinskaya I. B .**(2000) .the cellular location of proteolytic enzymes of *Bacillus intermedius* .*Microbiology (Moscow)* 69 :660-662 .
- Sharma R. ; Chisti Y .; Banerjee U .C**(2001) . production, purification, characterization and application of lipases .
- Sokol M.Kawaharajo K. J. Homma Y. Aoyama K. Moriharak .**(1979) .Effects of protease and elastase from *Pseudomonas aeruginosa* on skin .*Jpn J Exp Med* ,45 :79-88 .
- Stackbrandt E. ; Ludwing W. Weizenegger M .**(1987) .Comparative 16S rRNA oligonucleotide analyses and murein types of round –spore-forming *Bacilli* and non spore-forming relatives .*J. Gen. Microbiol* . ; 133 :2523-2529.

Thanh N. T.(1978) . Untersuchungen zur Regulation der Amylasebildung durch *Penicillium citrium* und der Proteasebildung durch *Bacillus cereus* var. *Mycooides* Desseccion technol. , 8 :547-548 .

Toderet al (1991) ; Gambello et Iglewski , (1991) ; Gambello et al ,(1993) . The hierarchy of quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*, 6, pages 26–41.

Todorov S.D .; DICKS L. M. T. (2009) . Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scorocarya birrea*) . International journal of food microbiology , 123 :117-126.

Touaitia R,(2020) . Microbiologie générale .02 :35-36.

Yilmaz M ., Soran H . Beyati Y ; (2005) . Determination of polyhydroxybutyrate production by some *Bacillus* spp J . Microbio&Biotech . 21 :565-566 .

Zouari N Jaoua S ,(1999) . The effect of complex carbon and nitrogen , salt , tween-80 and acetate on delta-endotoxin production by a *Bacillus thuringiensis* subsp *Kurstaki* . Journal of industrial Microbiology and Biotechnology , 23 :497-502.

Liens utilisés

www.anses.fr

www.inra.fr

www.mdpi.com

www.gbif.org

www.sfm-microbiologie.org

www.biomicrobio.fr

www.perrin33.com

www.microbe-canvas.com

www.univ-brest.fr

www.biochimej.univ-angers.fr

www.microbiologiemedicale.fr

Annexes

Milieu TGEA : (tryptone , glucose , extrait de levure , agar) :

Tryptone5g /l
Glucose.....2,5g /l
Extrait de levure.....1g/l
Agar.....15g/l
Eau distillée1000ml

Gélose nutritive (GN) :

Peptone.....5g/l
Extrait de levure.....2 g/l
Extrait de viande1 g/l
Chlorure de sodium..... 5 g/l
Agar15 g/l
Eau distillée1000ml

Milieu Viande-foie :

Peptone viande-foie30 g/l
Glucose2 g/l
Amidon soluble2 g/l
Sulfite de sodium 2,5 g/l
Citrate ferrique ammoniacal..... 0,5 g/l
Agar agar11 g/l

