

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض
Faculté Des Sciences de la Nature et de
la Vie et des Sciences de la Terre
Département : des sciences biologiques



جامعة الجيلالي بونعامة – خميس مليانة
Université Djilali Bounaama
Khemis Miliana
قسم : علوم البيولوجيا

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Science de la nature et de la vie

Filière : Biotechnologie.

Spécialité : Biotechnologie microbienne

THEME

Valorisation d'un isolat de *Bacillus* dans la production de protéase thermostable

Réalisé par:

BOUDJEMA Fatima

BELKATEB Aya

Soutenu le 25/06/2025 devant le jury composé de :

| | | | |
|---------------------|-------------------|-----|-------------------|
| Président(e) | Mme GHOMARI F. N. | MCA | U. Khemis Miliana |
| Promoteur | M AIZI D. | MCB | U. Khemis Miliana |
| Examinatrice | Mme BOUCHIBA Z. | MCA | U. Khemis Miliana |

Année universitaire : 2024/2025

Remerciements

Nous tenons à exprimons tout d'abord nos profonds remerciements et louanges à dieu « **ALLAH** »

le tout puissant le miséricordieux qui nous a guidé sur le droit chemin et de nous avoir accordé la

Santé la force la volonté le courage et la patience pour mener ce modeste travail à son terme.

Au terme de ce travail nous tenons d'abord à adresser notre profonde et sincère gratitude à notre

Dr AIZI Djamel Eddin d'avoir accepté de nous encadrer et de nous diriger.

Nous ne saurions jamais oublier sa disponibilité, Sa compétence et ses conseils pour la réalisation

de notre travail de recherche.

Nous exprimons nos vifs remerciements à l'ensemble des membres de jury au Présidente

Dr GHOMARI et **Dr BOUCHIBA** entant qu'examinatrices, pour avoir mobilisé de leur temp

pour examiner et juger ce travail.

Aux personnels du laboratoire de Microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie

de l'université de Khemis Miliana. Surtout Mm Wassila Aux et enseignants qui ont contribué à

notre formation universitaire.

MERCI

Dédicace

À ceux qui ont semé dans mon cœur les graines de la détermination,
et qui m'ont nourrie d'amour et de prières jusqu'à ce que ce rêve devienne réalité...

Ma chère mère : **Houria**

Source de tendresse, lumière dans mes moments les plus sombres,

À mon cher père, **Abdelkader** :

Mon pilier et mon modèle, qui m'a appris que la volonté rend tout possible

À ma sœur **Manel**, complice de mes jours et première amie de mon cœur

À mes frères jumeaux, **Mohamed** et **Youssef**, joie et éclat de ma vie

À ma tante Fatiha, une seconde mère pleine d'amour et de bienveillance

À mes précieuses amies : **ASMA**, **FATIMA**, **GHADA** et **KAOUTHER**, pour leur amitié sincère et leur soutien constant.

À ma partenaire de parcours, **Aya**, qui a été un véritable soutien à chaque étape

À Madame **BOUCHIBA**, pour son aide et son accompagnement bienveillant

Je dédie ce travail modeste, en témoignage de ma reconnaissance, de mon amour et de ma gratitude.

Sans vous, je ne serais pas celle que je suis aujourd'hui.

Fatima (Rania)

Dédicace

Par la grâce de Dieu Tout-Puissant qui a tracé le chemin de ma vie

Et m'a guidé à chaque étape j'ai pu accomplir ce modeste travail.

Je tiens à le dédier de tout cœur à :

Mon cher père : **Hakim**

L'homme le plus précieux à mes yeux, la lumière de mon regard, le parfum de mes pas

Et la source de mon bonheur. Il a sacrifié toute sa vie pour me voir réussir et devenir la personne que je suis aujourd'hui. Que Dieu te protège et te garde en bonne santé.

Ma chère maman : **Rabia**

Un pilier fort et inébranlable dans mon parcours. Elle m'a toujours soutenue, encouragée et portée avec amour et sagesse. Elle est ma force et ma motivation.

Que Dieu lui accorde une longue vie pleine de santé et de sérénité.

Mes frères : **Mohammed et Fares**

Je vous souhaite une réussite éclatante et une persévérance sans faille dans tout ce que vous entreprenez.

À tous les membres de mes familles **BELKATEB** et **SELMI**

Votre présence et votre soutien ont toujours été précieux.

À ma cousine **CHAIMA** et ma tante **GHADA**

Merci pour votre amour et votre bienveillance.

À mes chères amies : **FATIMA, ASMAA, et KAOUTHER**

Merci pour tous les souvenirs partagés, les rires, les confidences, et les moments de complicité.

Une dédicace toute particulière à ma binôme, **FATIMA** :

Nous avons traversé ensemble les moments les plus difficiles. Ton soutien, ta patience et ta présence ont été inestimables. Merci d'avoir été à mes côtés, toujours.

Aya

Abstract

This study is part of an approach to valorize a thermophilic isolate belonging to the genus *Bacillus*, as a potential source of thermostable proteases intended for biotechnological applications, particularly in detergent formulations. The isolate was subjected to various microbiological, biochemical and enzymatic tests. The results highlighted significant proteolytic activity, particularly in the presence of substrates such as casein or skimmed milk, as well as appreciable performance in washing tests. These characteristics make this strain a promising candidate, offering an ecological and effective alternative to chemical enzymes traditionally used in the detergent sector.

key words: Protease, thermophilic bacillus, detergents, enzymatic activity, thermostable enzymes

Résumé

Cette étude s'inscrit dans une démarche de valorisation d'un isolat thermophile appartenant au genre *Bacillus*, en tant que source potentielle de protéases thermostables destinées à des applications biotechnologiques, notamment dans les formulations de détergents. L'isolat a été soumis à divers tests microbiologiques, biochimiques et enzymatiques. Les résultats ont mis en évidence une activité protéolytique significative, en particulier en présence de substrats tels que la caséine ou le lait écrémé, ainsi qu'une performance appréciable dans les essais de lavage. Ces caractéristiques font de cette souche une candidate prometteuse, offrant une alternative écologique et efficace aux enzymes chimiques traditionnellement utilisées dans le secteur des détergents.

Mots clés : Protéase, *Bacillus thermophile*, détergent, activité enzymatique, enzymes thermostables

ملخص

تُعدّ هذه الدراسة جزءاً من نهجٍ لتثمين عزلةٍ مُحببةٍ للحرارة من جنس العصويات، كمصدرٍ مُحتملٍ للبروتينات المُستقرة حرارياً والمُخصصة للتطبيقات التكنولوجية الحيوية، وخاصةً في تركيبات المنظفات. خضعت العزلة لاختباراتٍ ميكروبيولوجيةٍ وكيميائيةٍ حيويةٍ وإنزيميةٍ مُختلفة. أظهرت النتائج نشاطاً بروتينياً ملحوظاً، لا سيما في وجود ركائز مثل الكازين أو الحليب منزوع الدسم، بالإضافة إلى أداءٍ مُلفتٍ في اختبارات الغسيل. تجعل هذه الخصائص هذه السلالة مُرشحاً واعداً، حيث تُقدّم بديلاً بيئياً وفعالاً للإنزيمات الكيميائية المُستخدمة تقليدياً في قطاع المنظفات

الكلمات المفتاحية : البروتياز، العصية المحبة للحرارة، المنظفات، النشاط الإنزيمي، إنزيمات مقاومة للحرارة

Table de matière

Table de matière

Abstract

Résumé

ملخص

| | |
|--|----|
| Introduction : | 2 |
| Partie 01:Etude bibliographique | 3 |
| 1. Taxonomie et Caractéristiques Générales du Genre <i>Bacillus</i> | 4 |
| 2. Adaptations des Bacillus aux Environnements Thermiques | 4 |
| 3. Stabilité structurale des protéines | 5 |
| 4. Composition lipidique et intégrité membranaire | 5 |
| 5. Stabilisation de l'ADN | 5 |
| 6.Généralité sur les enzymes | 5 |
| 7. Enzyme thermostable | 6 |
| 8.Enzyme Protéases | 7 |
| 9. Classification des protéases | 7 |
| 9.1. Elles se distinguent aussi en deux catégories selon leur lieu d'action : | 8 |
| 9.1.1. Les exopeptidases | 8 |
| 9.1.2. Les endopeptidases | 8 |
| 9.2. Selon la localisation cellulaire | 9 |
| 9.2.1. Les protéases intracellulaires | 9 |
| 9.2.2. Les protéases extracellulaires | 9 |
| 9.3. Selon leur besoin en ATP | 9 |
| 10. Sources des protéases | 10 |
| 10.1. Origine animale | 10 |
| 10.1.1. Trypsine | 10 |
| 10.1.2. Chymotrypsine | 10 |
| 10.1.3. Pepsine | 10 |
| 10.1.4. Chymosine | 10 |
| 10.2. Origine végétale | 10 |
| 10.2.1. papaine | 11 |
| 10.2.2. bromélaïne | 11 |
| 10.2.3. kératinase | 11 |
| 10.3. Origines microbiennes | 11 |

| | |
|--|----|
| 10.3.1. Origines bactériennes | 11 |
| 10.3.2. Origines fongiques | 12 |
| 10.3.3. Origines levures | 12 |
| 10.3.4. Origines virales | 12 |
| 11. Mode d'action de protéase | 13 |
| 12. Production de protéase | 13 |
| 12.1. La fermentation en milieu solide : | 13 |
| 12.2. Fermentation en milieu liquide (FML) : | 14 |
| 13. Applications des protéases | 16 |
| Partie 02 : Matériel et méthodes | 24 |
| 1. Objectif de l'étude : | 21 |
| 2. Matériels et méthode | 21 |
| 2.1. Matériels | 21 |
| 2.2. Méthodes : | 21 |
| 2.2.1. Purification | 21 |
| 2.2.2. Conservation des souches | 21 |
| 2.2.2.1. Conservation à court terme | 21 |
| 2.2.2.2. Conservation à long terme | 21 |
| 3 . Identification des souches | 22 |
| 3.1. Etudes macroscopiques : | 22 |
| 3.2. Etude microscopique : | 22 |
| 3.2.1. Examen à l'état frais | 22 |
| 3.2.2. Coloration de Gram | 23 |
| 4. Galerie classique | 25 |
| 4.1. Test catalase : | 25 |
| 4.2. Test Oxydase | 25 |
| 4.3. Test indole | 26 |
| 4.4. Test au rouge de méthyle | 27 |
| 4.5. Test Voges Proskauer (VP) | 28 |
| 4.6. Test d'utilisation du citrate | 29 |
| 4.7. Test nitrate reductase | 30 |
| 4.8. Test uréase | 31 |
| 4.9. Test mannitol mobilité | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 4.10 .Test de sporulation..... | 33 |
| 4.11.Test de hydrolyse de gélatine | 34 |
| 4.12. Test de type respiratoire..... | 34 |
| 4.13. Test Hydrolyse de la lécithine | 35 |
| 4.14 Test de croissance à différentes T° | 36 |
| 4.15. Identification biochimique par la Galerie api 20 ^E | 36 |
| 4.16. Test de sensibilité aux antibiotiques :..... | 37 |
| 5. Etude de l'activité enzymatique | 38 |
| 5.1. Activité amylolytique | 38 |
| 5.2 Activité cellulosique..... | 38 |
| 5.3. Activité lipolytique | 39 |
| 5.4.Activité protéolytique..... | 39 |
| 6. Production de protéase en milieu solide FMS..... | 39 |
| 6.1. Production de protease par caséine | 39 |
| 6.2. Production de protease par lait écrémé..... | 41 |
| 7. Evaluation de l'efficacité du lavage | 42 |
| Partie 03: Résultats et discussion | 44 |
| 1.Résultat de l'identification..... | 50 |
| 1.1. Identification Macroscopique des isolats bactériens | 45 |
| 1.2 Identification microscopique..... | 46 |
| 2. Résultats de Galerie Classique | 46 |
| 2.1. Résulta de Test Catalase | 47 |
| 2.3 .Résultat de test Indole..... | 47 |
| 2.4. Résultats de test RM et VP | 48 |
| 2.5. Résultat Test d'utilisation du citrate | 49 |
| 2.6. Résultat de test nitrate réductase..... | 50 |
| 2.7. Résultat de test uréase..... | 51 |
| 2.8. Résultat de Test mannitol mobilité | 52 |
| 2.9. Résultat de test de sporulation | 53 |
| 2.10. Résultat de Test hydrolyse de gélatine | 54 |
| 2.11. Résultat de Test de type respiratoire | 55 |
| 2.12. Résultat de Test Hydrolyse de la lécithine | 56 |
| 2.14. Galerie API 20 E | 57 |

| | |
|---|------------|
| 2.15. Résultat de l'antibiogramme | 59 |
| 3. Résultat de l'étude de l'activité enzymatique | 61 |
| 3.1. Activité amylolytique | 62 |
| 3.2. Activité cellulosique..... | 62 |
| 3.3. Activité lipolytique. | 62 |
| 3.4. Activité protéolytique..... | 62 |
| 4. Production de protéase | 62 |
| 4.1 .Production de protéase par caséine | 62 |
| 4.1.1. Méthode de puits | 63 |
| 4.1.2 .Méthode de disques | 63 |
| 4.2. Production de protéase par lait écrémé..... | 64 |
| 4.2.1. Méthode de puits | 64 |
| 4.2.2. Méthode de disques | 65 |
| 5. Test de lavage..... | 66 |
| Conclusion Général | 72 |
| Référence Bibliographique | 81 |
| Annexes..... | 127 |

Liste des tableaux :

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : classification des enzyme | 6 |
| Tableau 2 : Catégorisation des protéases En fonction du type de site catalytique | 8 |
| Tableau 3 : Comparaison des principales caractéristiques de la FMS et de la FML | 14 |
| Tableau 4 : Les différentes applications des protéases..... | 16 |
| Tableau 5 : Caractérisation macroscopique des isolats bactériens..... | 45 |
| Tableau 6 : présente les observations microscopiques des isolats bactériens, incluant l'examen à l'état frais (mobilité) ainsi que les résultats de la coloration de Gram. | 46 |
| Tableau 7 : Résulta de test catalase et oxydase | 47 |
| Tableau 8 : Résultat de test indole | 48 |
| Tableau 9 : Résultats de test RM et VP | 49 |
| Tableau 10 : Résultat Test d'utilisation du citrate | 50 |
| Tableau 11 : Résultat de test nitrate réductase | 51 |
| Tableau 12 : Résultat de test uréase | 52 |
| Tableau 13 : Résultat de Test mannitol mobilité..... | 52 |
| Tableau 14 : Résultat de test de sporulation..... | 53 |
| Tableau 15 : Résultat de Test hydrolyse de gélatine | 54 |
| Tableau 16 : Résultat de Test de type respiratoire | 55 |
| Tableau 17 : Résultat de Test Hydrolyse de la Lécithine..... | 56 |
| Tableau 18 : Résultat de Test de croissance à différente température | 57 |
| Tableau 19 : Résultat de la galerie API 20E de la souche (B1) | 58 |
| Tableau 20 : Résultat de la galerie API 20E de l'isolat (B2). | 59 |
| Tableau 21 : Résultat de l'antibiogramme des isolats isolées | 60 |
| Tableau 22 : Zones d'hydrolyses des isolats bactériennes testées après 48 h d'incubation. | 61 |
| Tableau 23 : Activités hydrolytiques des souches bactériennes après 48h d'incubation. | 62 |
| Tableau 24 : représentent les Diamètre des Zone par méthode des puits..... | 63 |
| Tableau 25 : représentent les Diamètre des zone par méthode des disques | 64 |
| Tableau 26 : représentent les Diamètre de zone par méthode des puits..... | 65 |
| Tableau 27 : représentent les Diamètre de zone par méthode des disques..... | 65 |
| Tableau 28 : Comparaison les caractéristiques biochimique de souche B1 | 68 |
| Tableau 29 : Comparaison les caractéristiques biochimique de souche B2..... | 69 |

Liste des figures :

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Structure tridimensionnelle de Enzyme protéolytique..... | 7 |
| Figure 2 : Protocole de Examen à l'état frais | 23 |
| Figure 3 : Protocole de coloration de Gram | 24 |
| Figure 4 : Résultats du Test catalase. | 25 |
| Figure 5 : Résultats du Test Oxydase | 26 |
| Figure 6 : Résultats du test d'indole..... | 27 |
| Figure 7 : Résultats du test RM. | 28 |
| Figure 8 : Résultats de test VP | 29 |
| Figure 9 : Résultats de Test d'utilisation du citrate. | 30 |
| Figure 10 : Résultats de la réduction des nitrates..... | 31 |
| Figure 11 : Résultats du test d'urée..... | 32 |
| Figure 12 : Protocole et résultats de TestGelatinHydrolysis..... | 34 |
| Figure 13 : Résultats de test type respiratoire | 35 |
| Figure 14 : Apparence de la galerie API 20 E dans son état initial, avant l'introduction des suspensions bactériennes | 36 |
| Figure15 : Résultats de. Test de sensibilité aux antibiotiques (Nijris, 2022). | 38 |
| Figure 16 : Production de protease par caséine | 40 |
| Figure 17 : Production de protéase par lait écrémé | 41 |
| Figure18 : Analyse de la performance du lavage par enzyme protéase (milieu caséine).... | 43 |
| Figure 19 : Analyse de la performance du lavage par enzyme protéase (milieu lait écrémé). 43 | |
| Figure20 : Aspect macroscopique des colonies sur GN | 45 |
| Figure 21 : Visualisation au microscope des isolats bactériennes étudiées après coloration de Gram (grossissement X100)..... | 46 |
| Figure 22 : Résulta de test Catalase et oxydase..... | 47 |
| Figure 23 : Résulta de test indole | 48 |
| Figure 24 : Résultats de test VP | 55 |
| Figure 25 : Résultats de test RM | 49 |
| Figure 26 : Résulta de test citrate de Simmons | 50 |
| Figure 27 : Résultat de test nitrate réductase..... | 51 |
| Figure 28 : Résultat de test uréase | 52 |
| Figure 29 : Résultat de Test mannitol mobilité | 53 |
| Figure 30 : Visualisation au microscope des isolats bactériennes étudiées après coloration de malachite verte (grossissement X100)..... | 54 |
| Figure 32 : Résultat de Test de type respiratoire | 56 |
| Figure 33 : Résultat de Test Hydrolyse de la lécithine..... | 57 |
| Figure 34 : Résultat de la galerie API 20 E de l'isolat (B1)..... | 58 |
| Figure 35 : Résultat de la galerie API 20 E de l'isolat (B2)..... | 59 |
| Figure 36 : Résultat de l'antibiogramme de B1 | 60 |
| Figure 37 : Résultat de l'antibiogramme de B2..... | 61 |
| Figure 38 : Activité protéasique des surnageants de milieu, en présence de caséine, pour les isolats B1 et B2, évaluée par la méthode des puits | 63 |

| | |
|---|----|
| Figure 39 : Activité protéasique des surnageants de milieu, en utilisant la caséine comme substrat, pour les isolats B1 et B2, évaluée par la méthode des disques. | 64 |
| Figure 40 : représentant l'activité protéasique des surnageants de milieu, en utilisant le lait écrémé comme substrat, pour les isolats B1 et B2, évaluée par la méthode des puits. | 65 |
| Figure 41 : Activité protéasique des surnageants de milieu, avec le lait écrémé comme substrat, pour les isolats B1 et B2, évaluée à l'aide de la méthode des disques. | 66 |
| Figure 42 : Résultat de test de lavage par enzyme protéase (caséine)..... | 66 |
| Figure 43 : Résultat de test de lavage par enzyme protéase (lait écrémé)..... | 67 |

Liste des abréviations :

% : Pourcentage

µg : Micro gramme

µL : Micro litre

AC : Activité coagulante

ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine

ADH : Arginine dihydrolase

AMY: amygdaline

AP : Activité protéolytique

ARA: Arabinose

ATP : Adénosine triphosphate

Aw : Activité de l'eau

C° : Degré Celsius

CaCl₂ : chlorure de calcium

CIT : Citrate

Cm : Centimètres

CMC : Carboxyméthyl cellulose

G : Gramme

GEL : Gélatinase

GLU: glucose

GN : Gélose nutritive

H : Heure

H₂O : Eau

H₂O₂ : Peroxyded'hydrogène

H₂S : Sulfure d'hydrogène

IND: indole

INO: Inositol

KCl : Chlorure de potassium

Kda : Kilodaltons

KH₂PO₄ : Phosphatemonopotassique

KOH : Hydroxyde de potassium

L : Litre

LDC : Lisine décarboxylase

Man: Mannitol

MEL: Melibiose

MgSO₄ : Sulfate de magnésium

MH : Mueller-Hinton

Min : Minute

MM : Millimètres

NaCl : Chlorure de sodium

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

NM : Nanomètre

NR : Nitrate réductase

O₂ : Oxygène

ODC : Ornithine décarboxylase

OH : Hydroxyle

ph : Potentiel Hydrométrique

RHA: Rhamnose

RM : Rouge de méthyle

S : Seconde

SAC: Saccharose

SML : Fermentation en milieu liquide

SMS : Fermentation en milieu solide

SOR: sorbitol

T : Température

TDA: Tryptophane désaminase

URE : Uréase

UV : Ultra violet

V : volume

VF : Viande foie

VP : Voges Proskauer

Introduction

Etude Bibliographique

Introduction :

Les enzymes d'origine microbienne occupent une place centrale dans de nombreuses industries, en raison de leur haute efficacité catalytique, de leur spécificité vis-à-vis des substrats et de leur faible impact environnemental. Parmi celles-ci, les protéases dominent largement le marché des enzymes industrielles, représentant environ 60 % de la production mondiale (**Rao et al., 1998**). Leur aptitude à hydrolyser les liaisons peptidiques des protéines les rend indispensables dans des secteurs comme l'agroalimentaire, la transformation du cuir, l'industrie pharmaceutique, ainsi que dans le domaine des produits détergents (**Gupta et al., 2002**).

Dans l'industrie des détergents, les protéases sont utilisées pour éliminer les salissures riches en protéines telles que le sang, les œufs ou encore la transpiration, que ce soit sur les tissus ou diverses surfaces. Pour être efficaces dans les conditions de lavage modernes généralement à pH élevé, à température accrue et en présence de surfactants il est nécessaire d'avoir recours à des protéases à la fois thermostables et actives en milieu alcalin (**Beg et Gupta, 2003**).

Parmi les micro-organismes capables de produire de telles enzymes, les espèces thermophiles du genre *Bacillus*, telles que *B.licheniformis*, *B.subtilis* et *B. stearothermophilus*, se démarquent par leur capacité à synthétiser des protéases extracellulaires robustes, actives à haute température et résistantes aux variations de pH. Ces caractéristiques sont particulièrement recherchées pour les formulations enzymatiques utilisées dans les produits de lessive (**Haddar et al., 2009**).

La production optimale de ces enzymes repose sur plusieurs paramètres essentiels : le pH, la température, ainsi que la nature des sources de carbone et d'azote présentes dans le milieu de culture. Après production, l'enzyme peut être partiellement purifiée puis testée en présence de détergents commerciaux afin d'évaluer sa stabilité et son efficacité détachante (**Nisha et Divakaran, 2014**).

Ce travail de recherche a pour objectif l'isolement de souches thermophiles de *Bacillus* productrices de protéases, l'optimisation des conditions de culture pour en maximiser la production, et l'évaluation de leur potentiel d'application dans des formulations détergentes, dans une optique de développement d'alternatives enzymatiques plus durables, économiques et performantes pour l'industrie du nettoyage.

Etude Bibliographique

Etude Bibliographique

1. Taxonomie et Caractéristiques Générales du Genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus*, appartenant au phylum des Firmicutes et à la classe des *Bacilli* représente l'un des groupes bactériens les plus intensément étudiés en microbiologie, en raison de sa remarquable diversité phylogénétique, écologique et métabolique (**Logan et al., 2009 ; Gupta et al., 2020**). Ces bactéries sont classiquement décrites comme Gram-positives et de morphologie bacillaire. Toutefois, il est important de noter que certaines espèces peuvent présenter une coloration Gram variable en fonction de l'âge de la culture ou des conditions environnementales, un phénomène lié à des modifications de l'épaisseur ou de la composition de leur paroi cellulaire (**Gao et al., 2021**).

Une caractéristique morphologique fondamentale du genre *Bacillus* est sa capacité à former des endospores. Ces structures dormantes, hautement différenciées, possèdent une résistance exceptionnelle à des conditions physicochimiques défavorables, incluant les températures élevées, la dessiccation, les rayonnements UV ou ionisants, ainsi que la présence de désinfectants et de solvants organiques. Ce mécanisme de sporulation confère aux espèces du genre *Bacillus* une aptitude remarquable à la persistance dans une variété d'environnements, allant des sols aux milieux industriels. (**Nicholson et al., 2000 ; Setlow, 2014**).

Sur le plan métabolique, les *Bacillus* se distinguent par leur polyvalence nutritionnelle et physiologique. La majorité des espèces sont aérobies strictes ou anaérobies facultatives, capables de croître sur une vaste gamme de sources de carbone et d'azote. Cette flexibilité métabolique leur permet de jouer un rôle essentiel dans les cycles biogéochimiques, notamment ceux du carbone, de l'azote et du soufre (**Madigan et al., 2021**).

L'intérêt biotechnologique du genre *Bacillus* découle notamment de sa capacité à sécréter de nombreuses enzymes extracellulaires d'intérêt industriel. Ces enzymes comprennent, entre autres, des protéases, amylases, lipases, xylanases, cellulases et hémicellulases, qui sont activement explorées dans les secteurs de la bioénergie, de l'agroalimentaire, du textile et de l'environnement. (**Schallmey et al., 2004 ; Singh et al., 2022**).

2. Adaptations des *Bacillus* aux Environnements Thermiques

Certaines espèces du genre *Bacillus* sont qualifiées de thermophiles en raison de leur capacité à croître de manière optimale à des températures généralement supérieures à 45 °C, voire au-delà de 60 °C pour les espèces hyperthermophiles. Ces micro-organismes ont développé un ensemble d'adaptations physiologiques, structurales et moléculaires leur

Etude Bibliographique

permettant de maintenir l'intégrité et la fonctionnalité de leurs constituants cellulaires dans des conditions thermiques extrêmes (Vieille et Zeikus, 2001 ; Gomes et Steiner, 2004).

3. Stabilité structurale des protéines

Les protéines des *Bacillus thermophiles*, notamment les enzymes, présentent une conformation tridimensionnelle renforcée, leur conférant une stabilité remarquable à haute température. Cette robustesse est généralement attribuée à une densité accrue de liaisons ioniques (ponts salins), de ponts disulfure et d'interactions hydrophobes au sein de la structure protéique. Ces éléments permettent de limiter la dénaturation thermique et le dépliement irréversible des protéines (Sternier et Liebl, 2001 ; Razvi et Scholtz, 2006). De plus, la présence de protéines chaperonnes thermorésistantes, telles que DNAK, GROEL et GROES, joue un rôle crucial dans l'assistance au repliement correct des protéines et la prévention de leur agrégation en conditions de stress thermique (Richter et al., 2010).

4. Composition lipidique et intégrité membranaire

L'adaptation des *Bacillus thermophiles* à la chaleur passe également par des modifications spécifiques de la membrane cytoplasmique. Celle-ci contient une proportion plus élevée d'acides gras saturés à chaînes ramifiées ainsi que, chez certaines espèces, des lipides cycliques tels que les hopanoïdes, qui jouent un rôle analogue à celui du cholestérol chez les eucaryotes (Siliakus et al., 2017). Ces adaptations contribuent à réduire la fluidité excessive des membranes à haute température, assurant ainsi leur cohésion structurale et le maintien de leur fonction de barrière sélective (Konings et al., 2002).

5. Stabilisation de l'ADN

À des températures élevées, l'ADN bicaténaire est sujet à la dénaturation thermique, ce qui constitue une menace pour la viabilité cellulaire. Pour pallier cela, les *Bacillus thermophiles* stabilisent leur matériel génétique grâce à des protéines de liaison à l'ADN thermostables (histone-like proteins) et parfois une teneur en paires GC plus élevée, conférant une température de fusion plus élevée aux régions codantes

Ces facteurs contribuent à la préservation de l'intégrité génomique dans des environnements thermiquement contraignants (Di Giulio, 2003 ; Wang et al., 2015).

6. Généralité sur les enzymes

Etude Bibliographique

Les enzymes constituent des macromolécules protéiques de masse moléculaire élevée, s'échelonnant typiquement entre 10 et 100 kda. Elles exercent une fonction catalytique au sein des réactions chimiques, accélérant leur cinétique d'un facteur d'au moins 10^6 par rapport à leur déroulement spontané (**Granner, 2008**).

les enzymes sont ubiquitaires dans les cellules de l'ensemble des organismes vivants, où elles jouent un rôle prépondérant dans la régulation des processus métaboliques. Ces derniers assurent la conversion des nutriments en énergie et la biosynthèse des constituants cellulaires (**Drouin, 2005**).

En 2005, les efforts de chercheurs ont permis l'isolement et l'identification de plus de 3000 types distincts d'activités enzymatiques (**Patel et al., 2005**), tandis que la structure tridimensionnelle d'environ 1300 d'entre elles a été élucidée (**Leisola et al., 2001**).

Ce tableau présente la classification systématique des enzymes en six grandes classes (EC1 à EC6),

Tableau 1 : classification des enzyme (**Durand., 2017**).

| | |
|------|-----------------|
| EC 1 | Oxydoréductases |
| EC 2 | Transférases |
| EC 3 | Hydrolases |
| EC 4 | Lyases |
| EC 5 | Isomérasés |
| EC 6 | Ligases |

EC: classe de enzyme

7. Enzyme thermostable

Les enzymes thermostables se définissent par leur aptitude à conserver leur intégrité structurale et leurs propriétés catalytiques spécifiques à des températures élevées, pouvant atteindre 50 °C, sans subir de dénaturation. L'identification du potentiel des enzymes thermostables pour optimiser les taux de conversion à haute température a été reconnue comme un facteur déterminant dans l'amélioration de l'efficacité des processus industriels. L'utilisation de ces enzymes dans des procédures opérant à des températures élevées présente l'avantage significatif de minimiser le risque de contamination microbienne. De surcroît, elle contribue à

Etude Bibliographique

la réduction de la viscosité du substrat, à l'amélioration des vitesses de transfert de masse et à l'augmentation de la solubilité des composés lors des réactions. Les enzymes thermostables recèlent un potentiel industriel considérable en tant que biocatalyseurs (**Hussian et Leong, 2023**).

8. Enzyme Protéases

Les protéases, également appelées protéinases, sont des enzymes hydrolytiques spécialisées dans la dégradation des protéines. Elles facilitent la rupture des liaisons peptidiques entre les acides aminés à des endroits précis, accélérant ainsi le processus de protéolyse. Ces enzymes peuvent être produites aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur de la cellule, jouant un rôle essentiel dans de nombreux mécanismes biologiques. (**Kumar et al., 2008**).

Les enzymes protéolytiques sont présentes chez tous les êtres vivants et jouent un rôle essentiel dans la croissance et la différenciation des cellules. Les recherches ont montré que les micro-organismes représentent une source rentable et efficace de protéases, garantissant une production stable des produits recherchés. Grâce à leurs propriétés, ces enzymes sont largement utilisées dans divers secteurs industriels (**Sharma et al., 2019**).

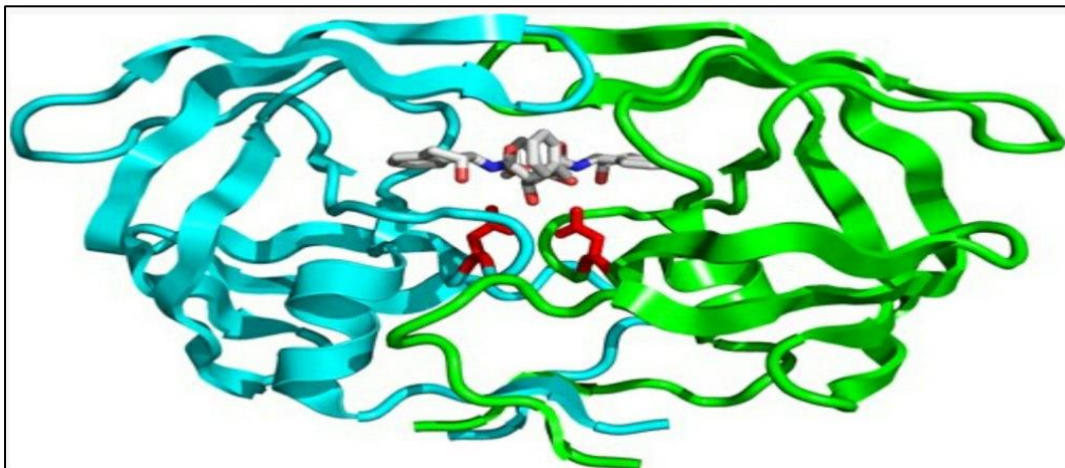


Figure 1 : Structure tridimensionnelle de Enzyme protéolytique (**creative- enzymes,2025**).

9. Classification des protéases

Les protéases se répartissent en trois catégories en fonction de la plage de pH où leur activité atteint son maximum : acides, neutres et alcalines (**Kumar et al., 2008**).

Etude Bibliographique

9.1. Elles se distinguent aussi en deux catégories selon leur lieu d'action :

9.1.1. Les exopeptidases

Ces enzymes catalysent la rupture des liaisons peptidiques situées aux extrémités N et C-terminales des protéines. On les classe en deux catégories : les aminopeptidases et les carboxypeptidases. Leur application industrielle reste relativement restreinte (**Mala et al., 1998**).

9.1.2. Les endopeptidases

Les endopeptidases ciblent préférentiellement les liaisons peptidiques situées au cœur de la chaîne polypeptidique, loin des extrémités N et C-terminales. Leur activité enzymatique est affectée négativement par la présence de groupes amino ou carboxyles libres. On les classe en quatre catégories selon leur mécanisme catalytique : (i) les protéases à sérine, (ii) les protéases à aspartate, (iii) les protéases à cystéine et (iv) les métalloprotéases (**Mala et al., 1998**).

Ce tableau 2 met en évidence la variété des protéases selon leur mode d'action enzymatique. Il différencie principalement les exopeptidases, telles que les aminopeptidases et les carboxypeptidases, des endopeptidases, regroupant notamment les protéases à sérine, à cystéine, à aspartate et les métalloprotéases.

Tableau 2 : Catégorisation des protéases En fonction du type de site catalytique (**Mala et al., 1998**).

| Types de protéases | Classe |
|-----------------------|---|
| Exopeptidases | Aminopeptidases Carboxypeptidases |
| Endopeptidases | Protéases à sérine Protéases cystéine ou protéases à thiols Protéases aspartique ou protéases acides Protéases thréonique |

Etude Bibliographique

| | |
|--|---|
| | Protéases glutamique Métallo protéases |
|--|---|

9.2. Selon la localisation cellulaire

En fonction de leur localisation dans la cellule, les protéases se divisent en deux types : celles présentes à l'intérieur de la cellule, dites intracellulaires, et celles situées à l'extérieur, qualifiées d'extracellulaires (**Mathieu, 2005**).

9.2.1. Les protéases intracellulaires

Ces protéases jouent un rôle essentiel dans la régulation des processus cellulaires et métaboliques. Toutefois, leur utilisation dans l'industrie est moins attrayante, car leur extraction requiert une étape de lyse cellulaire préalable (**Mala et al., 1998**).

9.2.2. Les protéases extracellulaires

Ces enzymes jouent un rôle clé dans la fragmentation des protéines en peptides de petite taille, facilement assimilables par les cellules. Leur intérêt pour l'industrie est renforcé par le fait qu'elles peuvent être extraites sans nécessiter de lyse cellulaire préalable (**Mala et al., 1998**).

9.3. Selon leur besoin en ATP

Un autre critère de classification repose sur le besoin ou non d'ATP pour assurer le fonctionnement de ces enzymes (**Ganesh Kumar et al., 1998**).

Ce groupe de protéases comprend celles formées de plusieurs sous-unités intégrant à la fois des domaines d'ATPase et des domaines protéolytiques. Certaines protéases échappent à cette classification, comme les signaux peptidase des lipoprotéines. Malgré leur diversité, ces enzymes peuvent présenter une action ciblée, ce qui a suscité un intérêt croissant pour leur utilisation et leurs applications en biotechnologie (**Mathieu, 2005**).

Etude Bibliographique

10. Sources des protéases

10.1. Origine animale

Parmi les protéases animales les plus réputées, on retrouve la trypsine pancréatique, la chymotrypsine, la pepsine et la rénine. Ces enzymes jouent un rôle essentiel dans la dégradation des protéines présentes dans l'alimentation.

10.1.1. Trypsine : La trypsine, avec une masse moléculaire de 23,3 kDa, constitue l'enzyme digestive principale de l'intestin, responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires. Cette protéase à sérine cible spécifiquement les liaisons peptidiques associées aux groupes carboxyles, en présence de résidus de lysine et d'arginine. Elle est utilisée dans la préparation de milieux bactériens et pour diverses applications médicales spécifiques (**Mala et al., 1998**).

10.1.2. Chymotrypsine : une enzyme de 23,8 kDa de masse moléculaire, est naturellement présente dans les extraits pancréatiques d'animaux. En raison de son coût élevé, sa forme pure est exclusivement utilisée pour des applications liées au diagnostic et à l'analyse. Elle se distingue par sa capacité spécifique à hydrolyser certaines liaisons

10.1.3. Pepsine : une protéase acide de masse moléculaire 34,5 kDa, est largement présente dans l'estomac des vertébrés (**Rao et al., 1998**).

10.1.4. Chymosine : également connue sous le nom de pepsine (EC.3.4.23.4), est une protéase à aspartate ayant une masse moléculaire de 30,7 kDa. Elle joue un rôle clé dans la présure, élément fondamental du processus de coagulation du lait dans l'industrie laitière (**Pelmont., 1995**).

10.2. Origine végétale

Les enzymes végétales, en particulier les protéases, les plus fréquemment rencontrées, on retrouve la papaïne, la bromélaïne, la kératinase et la ficine. Ces enzymes occupent une place significative dans le groupe des protéases les plus courantes. (**Rao et al., 1998**).

Etude Bibliographique

10.2.1. papaïne : est une protéase classique qui possède une longue Issue de la plante équatoriale (*Caricacpapaya*), cette enzyme opère de manière optimale dans une plage de pH comprise entre 5 et 9. Elle présente également une stabilité remarquable, pouvant résister à des températures allant jusqu'à 90°C (**Rao et al., 1998**).

10.2.2. bromélaïne : Extraite de l'ananas (*Ananas comosus*), la bromélaïne agit efficacement dans une plage de pH allant de 5 à 9. Toutefois, elle perd son activité à 70°C, ce qui la rend moins thermorésistante comparée à la papaïne (**Rao et al., 1998**).

10.2.3. kératinase : intervient dans la dégradation de la kératine présente dans les cheveux et la laine, un processus clé pour la production d'acides aminés essentiels tels que la lysine. Son activité optimale se manifeste à un pH de 7,5 et une température de 50°C, selon les travaux de (**Lin et al., 1992**).

10.3. Origines microbiennes

D'après (**Chutmanop et al., 2008**), seules les protéines commerciales sont produites par des microorganismes. Elles présentent toutes les caractéristiques nécessaires à leur utilisation industrielle, selon (**Sandhya et al., 2005**). Quant aux protéases microbiennes, elles sont synthétisées par une grande diversité de bactéries, comprenant notamment les actinomycètes, les moisissures et les levures (**Devi et al., 2008**).

10.3.1. Origines bactériennes

Majoritairement neutres et alcalines, sont principalement produites par des organismes du genre *Bacillus*. Les protéases neutres présentent une activité optimale dans une plage de pH restreinte, allant de 5 à 8, et affichent une thermotolérance relativement faible. Leur vitesse de réaction modérée permet de limiter l'amertume des protéines alimentaires hydrolysées, contrairement aux protéinases d'origine animale, ce qui les rend particulièrement utiles dans l'industrie agroalimentaire. Parmi elles, la neutrase se distingue par son insensibilité aux inhibiteurs naturels des protéinases végétales, ce qui en fait un atout majeur pour l'industrie brassicole (**Mala et al., 1998**).

Les protéases neutres bactériennes sont reconnues pour leur forte affinité avec les paires d'acides aminés hydrophobes. Leur faible résistance à la chaleur est avantageuse pour maîtriser leur activité lors de la fabrication d'hydrolysats alimentaires à faible degré d'hydrolyse. Certaines d'entre elles appartiennent à la famille des métalloprotéases et nécessitent des ions

Etude Bibliographique

métalliques divalents pour fonctionner, tandis que d'autres sont des protéinases à sérine qui restent insensibles aux agents chélateurs. (Mala et al., 1998).

À l'inverse, les protéases alcalines bactériennes sont caractérisées par une activité accrue en milieu basique, avec un pH optimal avoisinant 10, et une large spécificité de substrat. Leur température idéale d'action est d'environ 60 °C, ce qui, associé à leurs propriétés uniques, les rend particulièrement adaptées à l'industrie des détergents (Mala et al., 1998).

10.3.2. Origines fongiques

Les champignons génèrent une diversité enzymatique plus vaste que les bactéries. Leurs protéases présentent une activité sur une large gamme de pH et une grande spécificité vis-à-vis des substrats. Dans l'industrie fromagère, ces enzymes sont particulièrement prisées pour leur capacité à agir dans des conditions précises de pH et de température (Rao et al., 1998). De plus, elles permettent une séparation aisée du mycélium par simple filtration et peuvent être produites efficacement grâce à la fermentation en milieu solide (Jisha et al., 2013).

10.3.3. Origines levures

Des recherches ont été menées sur diverses protéases présentes chez les levures. Par exemple, le gène codant la protéase alcaline d'*Aureobasidium pullulans*, une levure marine, a été inséré dans *Yarrowialipolytica*. De plus, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) a été examinée dans ce contexte. Par ailleurs, la protéase aspartique de *Candida albicans* jouerait un rôle essentiel dans la virulence de cette levure (Hadjidj, 2019).

10.3.4. Origines virales

Les protéases virales ont acquis une importance croissante en raison de leur rôle essentiel dans le traitement des protéines virales, impliquées dans des maladies graves comme le SIDA et certains cancers. Parmi ces enzymes, on retrouve des peptidases de sérine, d'aspartate et de cystéine dans divers virus. Il est notable que toutes les protéases codées par les virus sont des endopeptidases, et aucune d'entre elles n'appartient à la catégorie des métallo peptidases (Mala et al., 1998).

Les rétrovirus possèdent des protéases d'aspartate indispensables à l'assemblage et à la réplication virale. Ces enzymes se présentent sous forme d'homodimères et sont exprimées dans un précurseur de polyprotéine, dont la protéase mature est libérée par un processus d'autolyse. Une abondante littérature scientifique explore l'expression, la purification et l'analyse enzymatique de la protéase rétrovirale aspartique ainsi que de ses variantes (Mala et al., 1998).

Etude Bibliographique

Les recherches approfondies ont également porté sur la structure tridimensionnelle de ces protéases et sur leurs interactions avec des inhibiteurs synthétiques. L'objectif est de concevoir des inhibiteurs efficaces capables de freiner la propagation du SIDA et d'enrayer les effets dévastateurs de cette épidémie (Mala et al., 1998).

11. Mode d'action de protéase

Le mécanisme d'action des protéases varie d'une enzyme à l'autre en fonction de la structure de leur site actif, bien qu'elles suivent toutes un principe fondamental commun. Ce processus catalytique se déroule en trois étapes :

Tout d'abord, l'enzyme modifie la conformation de la liaison peptidique et accentue la polarisation du groupement carbonyle. Cette modification favorise l'attaque nucléophile, entraînant ainsi la formation d'une liaison covalente temporaire entre la partie carbonylée du substrat et l'enzyme, tandis que l'autre partie du substrat est libérée sous forme protonée grâce à un proton transféré par un résidu enzymatique.

Ensuite, une nouvelle substitution nucléophile intervient, impliquant le groupement hydroxyle (OH) d'une molécule d'eau. Cette réaction permet la libération du deuxième produit tout en restituant au site actif de l'enzyme son état initial, grâce à l'apport d'un proton issu de la molécule d'eau (Pelmont., 1995).

12. Production de protéase

Les protéases d'origine microbienne sont aujourd'hui obtenues grâce à deux principales techniques de fermentation : la fermentation en milieu solide (SMS) et la fermentation submergée (SML) (Razzaq et al., 2019).

12.1. La fermentation en milieu solide :

La fermentation en phase solide (FMS) est une approche technologique qui reproduit les conditions naturelles de développement des microorganismes, notamment des champignons filamenteux et supérieurs, en favorisant leur adhérence à un substrat organique. Elle se caractérise par l'utilisation de particules solides humides, avec une très faible présence d'eau libre, ce qui la différencie de la fermentation en milieu liquide, où les nutriments sont totalement dissous dans un grand volume d'eau. De même, elle se distingue de la fermentation submergée, où les éléments nutritifs se présentent sous forme de suspension de particules dans une phase liquide. La principale distinction entre ces procédés repose sur la répartition relative des phases

Etude Bibliographique

solide, liquide et gazeuse (**Pandey, 2003 ; Prevot, 2013**) La fermentation en phase solide (FMS) s'organise en trois composants distincts : une matrice solide, une phase liquide retenue au sein de cette matrice par absorption ou complexation, et une phase gazeuse emprisonnée, dont la proportion peut fluctuer entre 12 % et 90 %. Cette dernière correspond à une activité de l'eau (A_w) variant de 0,65 à 0,98 (**Prevot, 2013**).

12.2. Fermentation en milieu liquide (FML) :

Les fermentations en milieu liquide se déroulent dans des cuves spécialement conçues pour permettre le contrôle précis des conditions de croissance des microorganismes. Contrairement aux fermentations solides ou submergées, le milieu y est homogène, ce qui facilite le suivi de son évolution grâce à des capteurs mesurant des paramètres tels que le pH ou la température. Ce type de fermentation offre un meilleur encadrement du processus, avec peu d'impuretés, ce qui simplifie l'extraction des substances recherchées. Toutefois, il implique des volumes d'extraction plus importants que dans les autres types de fermentation. Les micro-organismes les plus fréquemment employés sont les bactéries et les levures, leur développement étant favorisé par une activité de l'eau (a_w) plus élevée. En revanche, les substrats solides d'origine organique conviennent peu à ce procédé et nécessitent des traitements préalables, qu'ils soient physiques, chimiques ou biologiques (**Godard, 2020**).

Ce tableau 03 établit une comparaison entre la fermentation en milieu solide (FMS) et celle en milieu liquide (FML), en mettant en lumière leurs principales différences concernant notamment le type de substrat utilisé, les besoins en aération, la consommation d'eau, le rendement obtenu ainsi que les risques de contamination. Cette analyse comparative permet de déterminer la technique la plus appropriée pour optimiser la production de protéases.

Tableau 3 : Comparaison des principales caractéristiques de la FMS et de la FML (**Try, 2018**).

| Caractéristiques | FMS | FML |
|------------------|--|---|
| Substrat | Un substrat relativement insoluble, reposant sur un support inerte, qu'il soit naturel ou artificiel, sert de milieu permettant le développement des micro-organismes. | Un substrat habituellement soluble mais qui ne convient pas à la production de lactone. |

Etude Bibliographique

| | | |
|--------------------------------|---|--|
| Aseptie | La stérilisation peut être réalisée par la chaleur, par un traitement à la vapeur ou être absente, selon la configuration du réacteur. | La stérilisation par la chaleur accompagnée d'un contrôle aseptique permet de garantir des conditions optimales d'hygiène. |
| Consommation d'eau | Présence d'une quantité restreinte d'eau associée à une faible activité de l'eau (A_w). | Un besoin élevé en eau pour le processus. |
| Chaleur métabolique | Une capacité réduite à transférer la chaleur efficacement. | Une régulation aisée de la température permettant un contrôle précis du processus. |
| Aération | Il est nécessaire de disposer d'un air riche en vapeur d'eau afin de garantir une interaction directe entre l'oxygène, le substrat et les microorganismes. Cette condition favorise les échanges essentiels à leur activité biologique. | La concentration d'oxygène soluble dans le milieu est restreinte, ce qui peut influencer les processus biologiques dépendant de son disponibilité. |
| Contrôle du pH | Il est recommandé de prétraiter le substrat ou le milieu de biotransformation en ajustant son pH avant de l'imprégner dans un support inerte, afin d'optimiser les conditions du processus biologique. | Facile à ajuster |
| Agitation mécanique | Aération statique préférée | Bonne homogénéisation. |
| Utilisation énergétique | Faible consommation d'énergie | Haute consommation d'énergie. |

Etude Bibliographique

| | | |
|----------------------|--|---|
| Contamination | Un faible taux de croissance des champignons accroît le risque de contamination, compromettant ainsi la stabilité du processus biologique. | Certaines bactéries présentent un risque accru de contamination, pouvant affecter la fiabilité et l'efficacité du processus biologique. |
| Productivité | Plus élevé | Plus faible |

13. Applications des protéases

Ce tableau résume les diverses utilisations des protéases dans plusieurs secteurs, notamment l'agroalimentaire (tels que la fromagerie, la panification et la transformation du soja), la formulation de détergents, ainsi que la production de composés spécifiques comme l'aspartame.

Tableau 4 : Les différentes applications des protéases.

| Applications | Principe |
|--------------------------------------|---|
| 1 / Applications alimentaires | <p>Fromageries ; Les protéases jouent un rôle essentiel dans la coagulation des protéines du lait. Dans l'industrie laitière, on a également recours à des protéases fongiques de différentes natures—acides, alcalines et neutres—pour diverses applications. (Aguilar et al., 2008).</p> <p>Boulangeries : Les protéases ont également été employées dans l'industrie laitière et sont présentes dans la farine de blé utilisée en boulangerie. De plus, les protéases d'origine bactérienne sont couramment utilisées pour améliorer l'élasticité et la résistance de la pâte. (Aguilar et al., 2008) –</p> <p>Dans la synthèse de l'aspartame : Les protéases, bien qu'appartenant à la catégorie des hydrolases, peuvent parfois catalyser la réaction inverse. Par exemple, la thermolysine dérivée de <i>Bacillus pyrolyticum</i> a été utilisée pour synthétiser l'aspartame, un édulcorant hypocalorique, à partir de l'acide L-aspartique et de l'ester méthylique de L-phénylalanine sous</p> |

Etude Bibliographique

| | |
|---|---|
| | <p>certaines conditions cinétiquement contrôlées. Toya Soda en assure la production à l'échelle industrielle (Leisola et al., 2001).</p> <p>Produits à base de soja : Depuis de nombreuses années, les protéases neutres et alcalines ont été utilisées dans la production de sauce soja et d'autres produits à base de soja. Leur action modifie les protéines de soja, améliorant ainsi leurs propriétés fonctionnelles. En particulier, la protéase alcaline à pH 8 permet de développer des hydrolysats de protéines solubles présentant des qualités nutritionnelles intéressantes. Ces hydrolysats servent ensuite de composants protéiques dans les jus, les boissons fruitées et les préparations alimentaires diététiques (Rao et al., 1998).</p> |
| <p>2 /</p> <p>Industrie des détergents</p> | <p>Les protéases jouent un rôle clé dans l'industrie des détergents grâce à leur capacité à éliminer efficacement les taches protéiques, un avantage que les méthodes classiques ne peuvent offrir (Gupta et al., 2002). Aujourd'hui, elles sont devenues des composants essentiels, représentant environ 25 % des ventes mondiales d'enzymes. Pour leur intégration dans les détergents, plusieurs critères sont primordiaux, notamment leur activité sur divers substrats, leur stabilité à des pH et températures élevés, ainsi que leur résistance en présence d'agents oxydants. À ce jour, les protéases sérines dérivées de <i>Bacillus</i> sp sont les seules utilisées dans les formulations commercialisées (Chellappan et al., 2006 ; Guo et Ma, 2008). Toutefois, des études récentes explorent l'emploi de protéases issues de sources fongiques, telles que <i>Penicillium</i> sp, <i>Aspergillus parasiticus</i>, <i>Condiobolus coronatus</i> et <i>Engyodontium album</i>, dans ce domaine (Chellappan et al., 2006).</p> |
| <p>3 /</p> | <p>La protéase d'<i>Aspergillus oryzae</i> est utilisée comme complément digestif pour compenser un déficit en enzymes</p> |

Etude Bibliographique

| | |
|---|---|
| <p>Domaine pharmaceutique et médicale</p> | <p>lytiques. L'asparaginase issue d'<i>Escherichia Coli</i> est employée dans le traitement de la leucémie lymphocytaire, tandis que la collagénase clostridienne est utilisée pour soigner les brûlures et les plaies. Quant à la nattokinase, produite par <i>Bacillus subtilis</i>, elle agit comme nutraceutique en contribuant à la prévention des maladies cardiovasculaires, notamment en limitant la formation de caillots sanguins et en dissolvant les thrombus. Par ailleurs, certaines protéases d'origine bactérienne et fongique ont démontré des propriétés antimicrobiennes. Elles interviennent aussi dans la dégradation de la peau kératinisée et la conception d'un vaccin contre la dermatophytose. Dans le domaine de la médecine des traumatismes, ces enzymes hydrolytiques aident à réduire les cicatrices, favoriser la régénération des épithéliums et accélérer le processus de guérison. (Singh et al., 2016)</p> |
| <p>4 / Traitement des eaux usées industrielles</p> | <p>Les protéases sont considérées comme une approche prometteuse pour le traitement des déchets industriels. Parmi elles, les enzymes protéolytiques issues de <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> et <i>Streptomyces</i> jouent un rôle clé. Dans ce domaine, diverses souches et espèces d'<i>Aspergillus</i> sont actuellement exploitées pour leurs capacités enzymatiques. (Gupta et al., 2002)</p> |
| <p>5 / Industrie du cuir</p> | <p>Les protéases jouent un rôle essentiel en décomposant les composants non collagéniques de la peau et en éliminant les protéines non fibrillaires. Les protéases microbiennes alcalines, en particulier, accélèrent l'absorption de l'eau, raccourcissant ainsi la durée du trempage. Leur utilisation, combinée à une réduction de la quantité de chaux hydratée et de chlorure de sodium lors du dépollage et du délaillage, contribue à une diminution des déchets. L'application de protéases alcalines dans le tannage du cuir offre donc une approche à la fois performante et respectueuse de l'environnement, permettant</p> |

Etude Bibliographique

| | |
|-----------------------------------|--|
| | d'améliorer la qualité du produit final tout en optimisant le temps et l'énergie nécessaires. (Singh et al., 2016) |
| 6 /Application en tannerie | Depuis le début du siècle dernier, l'industrie du cuir fait appel aux protéases pour leur capacité à éliminer les poils et la laine de la peau. Trois étapes essentielles du tannage le reverdissage, le délainage et le confitage reposent sur l'action enzymatique des protéases produites par <i>B. licheniformis</i> , <i>A. oryzae</i> et <i>B. amyloliquefaciens</i> . (Kumar et Takagi, 1999 ; Gupta et al., 2002) |

Matériel et méthodes

1. Objectif de l'étude :

Ce travail expérimental a été entièrement réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie de l'Université de Khemis-Miliana durant le second semestre de l'année universitaire 2024/2025.

L'objectif principal de cette étude est la production de protéase par une souche de *Bacillus thermophile*, avec une application potentielle dans le domaine des détergents. À cette fin, un échantillon a été prélevé à partir d'une source thermale située à Hammam Bouhdjer, dans la wilaya d'Aïn Témouchante.

2. Matériels et méthode

2.1. Matériels

2.1.1 Verrerie courante et appareillage (Annexe I)

2.1.2 Milieux et produits chimiques : (annexe II)

2.2. Méthodes :

2.2.1. Purification

- L'ensemencement a été réalisé sur un milieu de gélose nutritive
- La boîte a étéensemencée à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette Pasteur, en effectuant des stries espacées.
- Les boîtes ont ensuite été incubées à 45°C pendant 24 à 48 heures, jusqu'à l'observation des colonies. (Debabza, 2015).

2.2.2. Conservation des souches

2.2.2.1. Conservation à court terme : les isolats purifiés ont été ensemencés sur gélose nutritive inclinée à l'aide d'une anse de platine. Après une incubation de 24 heures à 45°C, les tubes ont été stockés au réfrigérateur à 4°C.

2.2.2.2. Conservation à long terme : les souches ont été cultivées en bouillon nutritif pendant 24 heures à 45°C. Une partie de la suspension bactérienne a ensuite été transférée dans des tubes Eppendorf, additionnée de 15 à 20 % de glycérol stérile à l'aide d'une pipette Pasteur. Afin d'assurer une préservation optimale, chaque souche a été conservée en plusieurs exemplaires. Les tubes ont finalement été placés au congélateur à -20°C (Debabza, 2014).

3. Identification des souches

3.1. Etudes macroscopiques :

L'examen macroscopique des cultures constitue la première étape d'analyse après isolement et incubation. L'apparence des colonies varie selon le milieu de culture, la durée et la température d'incubation. Une description précise n'est possible qu'à partir de colonies bien isolées, car plus les colonies sont proches, plus leur taille est réduite. **(Sidi Baba et Aminetou, 2008)**

Les caractéristiques des colonies ont été précisément relevées, notamment leur forme (circulaire, irrégulière, filamenteuse, bombée ou demi-bombée), leur taille, leur relief (lisse, plissé, ombiliqué), leur texture (muqueuse, sèche, poudreuse), leur pigmentation ainsi que leur opacité (transparente, translucide ou opaque) **(Sidi Baba et Aminetou, 2008)**

3.2. Etude microscopique :

3.2.1. Examen à l'état frais

Il s'agit de l'observation au microscope de bactéries vivantes placées en milieu liquide. Cette technique permet d'évaluer leur mobilité (ou absence de mouvement) ainsi que leur forme. Protocole de préparation **(Sidi Baba et Aminetou, 2008)**

À partir d'une culture en milieu liquide

1. Prélever une petite quantité de culture à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette Pasteur.
2. Déposer le prélèvement sur une lame propre.
3. Recouvrir délicatement d'une lamelle.

À partir d'une culture sur milieu solide

1. Placer une goutte de milieu liquide ou d'eau sur une lame propre.
2. Prélever une infime quantité de culture à l'anse de platine et la mélanger dans la goutte pour former une émulsion.
3. Recouvrir avec une lamelle. **(Sidi Baba et Aminetou, 2008)**

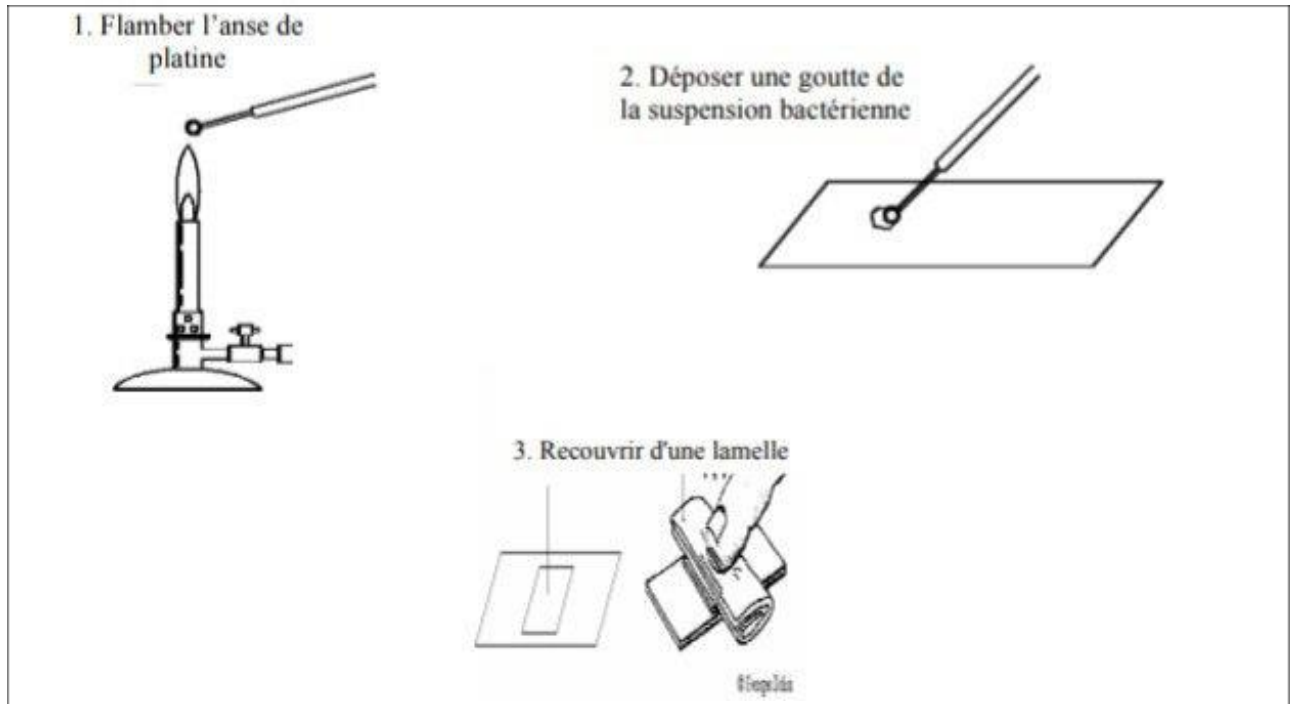


Figure 2 : Protocole de Examen à l'état frais (Sidi Baba et Aminetou, 2008)

3.2.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram, méthode de référence en bactériologie, classe les bactéries en Gram positif ou négatif, distinction primordiale pour leur identification (Sidi Baba et Aminetou, 2008)

Protocole : de coloration de Gram

Étapes de réalisation

- . Préparation du frottis

Étaler l'échantillon sur une lame propre.

Fixer par passage rapide à la flamme.

- . Coloration au Violet de Gentiane

- Recouvrir le frottis avec le Violet de Gentiane.

Laisser agir pendant 1 minute.

Éliminer l'excédent et appliquer le Lugol pendant 1 minute supplémentaire.

Matériel et méthode

- Décoloration à l'alcool

Rincer brièvement à l'éthanol pour éliminer les colorants en excès.

Arrêter immédiatement la décoloration par un rinçage à l'eau.

- Contre-coloration à la Safranine

Recouvrir la lame avec de la Safranine pendant 1 minute.

Rincer abondamment à l'eau pour éliminer le surplus.

- Examiner au microscope (objectif $\times 100$)

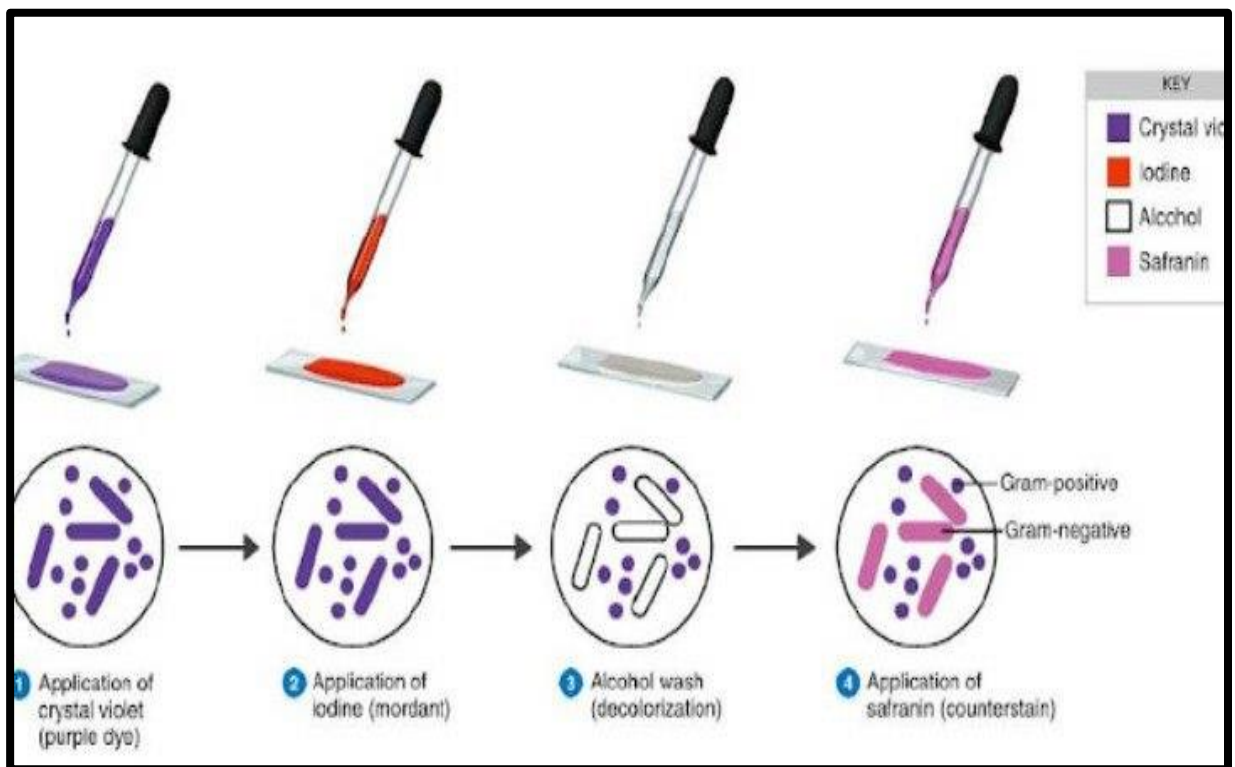


Figure 3 : Protocole de coloration de Gram (**medicinehack,2012**).

Lecture :

Bactéries Gram positif : Coloration violet foncé

Bactéries Gram négatif : Coloration rose/rouge pâle (**Sidi Baba et Aminetou, 2008**).

4. Galerie classique

4.1. Test catalase :

Principe :

Test de catalase : La catalase est une enzyme qui transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) (Harvey, 2007).

Technique :

Sur un milieu solide et aérobie, prélever une quantité appropriée de culture et la mélanger à une goutte d'eau oxygénée sur une lame (Bouras, 2018).

Lecture :

La formation immédiate de bulles d' O_2 indique la présence de catalase. (Bouras, 2018).

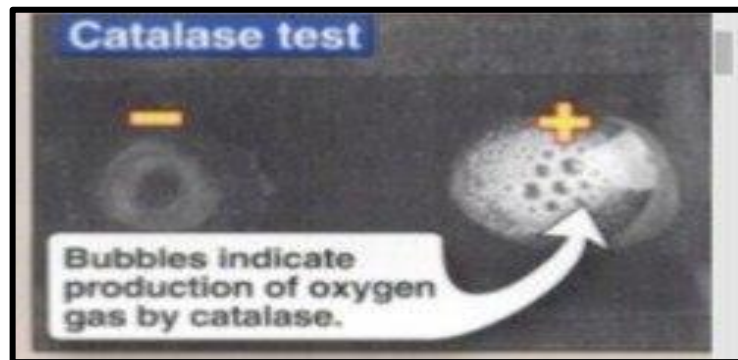


Figure 4 : Résultats du Test catalase (Harvey, 2007).

4.2. Test Oxydase

Principe :

L'oxydase est une enzyme catalysant une réaction d'oxydoréduction où le dioxygène (O_2) agit comme accepteur d'électrons (Bouras, 2018).

Technique

La détection de l'oxydase a été réalisée par la méthode des disques d'oxydase, qui consiste à :

- Déposer un disque d'oxydase sur une lame.
- Prélever une colonie avec une pipette Pasteur et l'étaler sur le disque (Bouras, 2018).

Lecture

Matériel et méthode

La présence d'une cytochrome-oxydase se manifeste par l'apparition d'une coloration rouge en 20 à 60 secondes, évoluant rapidement vers un violet très foncé (**Bouras, 2018**).

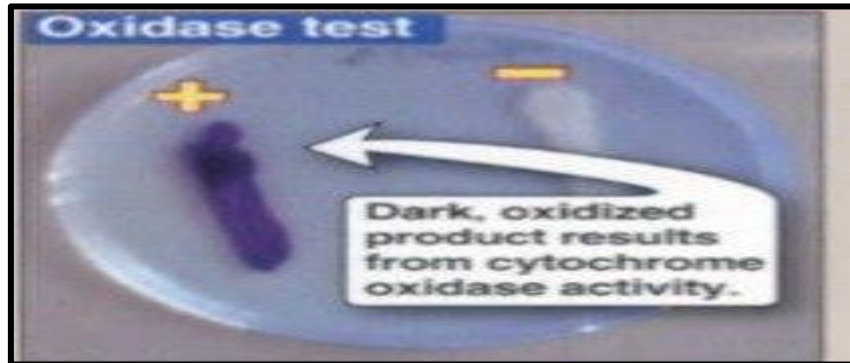


Figure 5 : Résultats du Test Oxydase (**Harvey, 2007**).

4.3. Test indole

Principe :

Ce test a pour but d'évaluer l'aptitude des micro-organismes à décomposer le tryptophane, un acide aminé essentiel, et à synthétiser de l'indole.

Son principe repose sur l'oxydation du tryptophane par certaines bactéries, grâce à l'enzyme Tryptophanase, générant ainsi de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac (**Nijris, 2022**).

Technique

Ensemencer les tubes de bouillon Peptoné avec la souche bactérienne testée. et incuber à 45°C pendant 24-48h.

Ajouter le réactif de Kovacs (quelques gouttes par tube).

Agiter légèrement et attendre 10-15 minutes avant lecture (**Nijris, 2022**).

Lecteur

Test positif : Formation d'un anneau rouge dans la partie supérieure du tube.

Test négatif : Absence d'anneau rouge (**Nijris, 2022**).

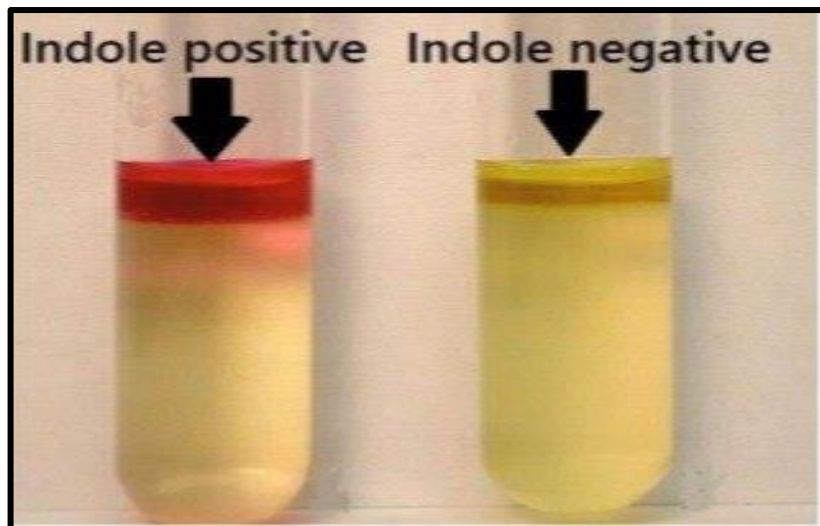


Figure 6 : Résultats du test d'indole (Nijris, 2022).

4.4. Test au rouge de méthyle

Objectif

Déterminer la capacité des micro-organismes à oxyder le glucose en produisant des acides stables comme métabolites terminaux (Nijris, 2022).

Principe :

L'oxydation du glucose est commune aux entérobactéries, mais les voies enzymatiques spécifiques à chaque souche conduisent à des profils métaboliques distincts (Nijris, 2022).

Technique :

Inoculer milieu Clark et lubs avec la souche bactérienne à étudier.

Mettre à incuber à 45°C pendant 24 à 48 heures.

Après la période d'incubation, ajouter précisément 3 gouttes de réactif de méthyl rouge.

Agiter le tube pour homogénéiser, puis interpréter la coloration obtenue (Nijris, 2022).

Lecture :

Positif : Rouge maintenu

Négatif : Changement en jaune (Nijris, 2022).

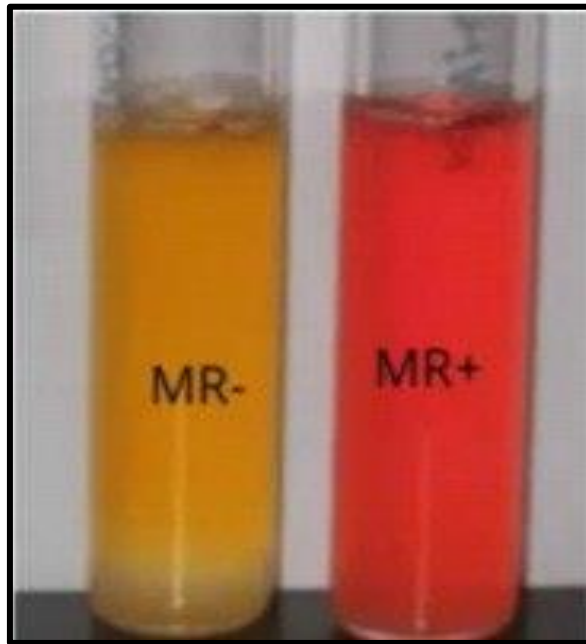


Figure 7 : Résultats du test RM (Nijris, 2022).

4.5. Test Voges Proskauer (VP)

Objectif et principe :

L'objectif de ce test est d'identifier les micro-organismes capables de synthétiser de l'acétone lors de la fermentation glucosée.

Il se base sur le mécanisme par lequel certaines bactéries dégradent les glucides, convertissant des acides organiques en substances au pH neutre (Nijris, 2022).

Technique :

Inoculation : Introduire la souche bactérienne à analyser dans un tube de Clark et Lubs

Incubation : Placer le tube à 45°C pendant 24 à 48 heures.

Ajout des réactifs :

Après incubation, verser 3 gouttes de VP1 (alpha-naphtol).

Ajouter 1 goutte de VP2 (hydroxyde de potassium, KOH).

Mélange : Agiter énergiquement les tubes pendant 30 secondes pour homogénéiser.

Temps de réaction : Laisser reposer 15 à 30 secondes afin que la réaction chimique se finalise.

Matériel et méthode

Interprétation : Examiner la couleur dans les tubes pour déterminer le résultat (Nijris, 2022).

Lecture :

Test positif : Un changement de couleur vers le rouge-rose indique une réaction positive.

Test négatif : Si le milieu conserve sa teinte jaune, le résultat est négatif (Nijris, 2022).

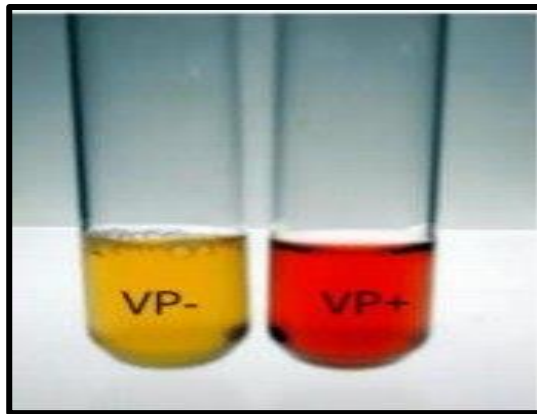


Figure 8 : Résultats de test VP (Nijris, 2022).

4.6. Test d'utilisation du citrate

Principe :

Le test du citrate distingue les entérobactéries selon leur aptitude à métaboliser le citrate en tant qu'unique source de carbone, en l'absence de glucose et de lactose. Cette propriété repose sur l'enzyme citrate-perméase, qui assure l'internalisation du citrate dans la cellule (Nijris, 2022). (Nijris, 2022).

Technique :

Inoculer le milieu de Simmons citrate avec la souche à tester

Réaliser des stries sur la partie inclinée du milieu

Incuber à 45°C pendant 24-48 heures (Nijris, 2022).

Lecture :

Positif : Le virage au bleu du milieu

Négatif : La persistance de la couleur verte (Nijris, 2022).

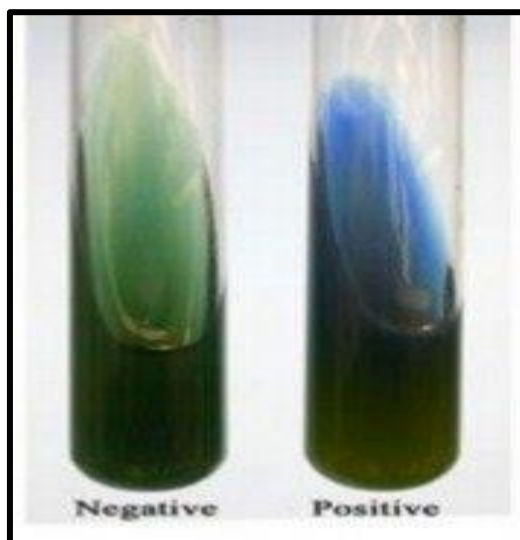


Figure 9 : Résultats de Test d'utilisation du citrate (Nijris, 2022).

4.7. Test nitrate reductase

Objectif et principe :

Ce test vise à déterminer la capacité des bactéries à produire l'enzyme nitrate réductase (Nijris, 2022).

Il repose sur la réduction des nitrates par certains microorganismes aérobies et anaérobies facultatifs lors d'un processus anaérobie en absence d'oxygène (Nijris, 2022).

Technique :

Ensemencement : Inoculer le bouillon nitraté avec isolat à analyser

Incubation : Maintenir le tube à 45°C pendant 24-48 heures

Réaction : Ajouter des volumes équivalents des solutions A et B du réactif nitrate

Lecture : Noter le virage colorimétrique éventuel (Nijris, 2022).

Lecture :

Test positif : Apparition d'une couleur rouge.

Test négatif : Si aucune couleur rouge n'apparaît, ajouter une petite quantité de zinc au milieu de test.

Matériel et méthode

Pas de couleur rouge après ajout du zinc → Test positif (réduction des nitrates en azote gazeux ou autres composés au-delà des nitrites).

Apparition d'une couleur rouge après ajout du zinc → Test négatif (absence de réduction des nitrates) (Nijris, 2022).

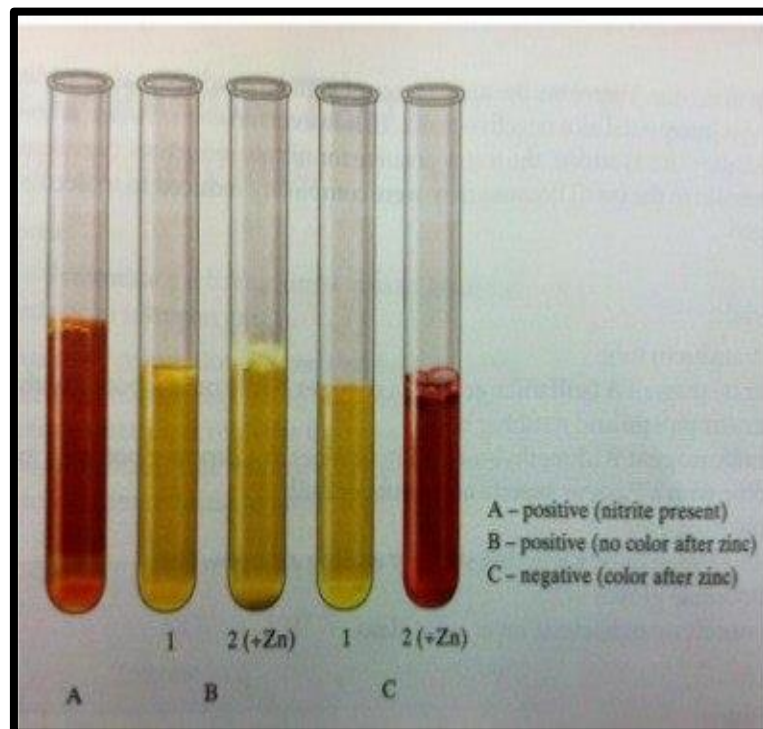


Figure 10 : Résultats de la réduction des nitrates (Nijris, 2022).

4.8. Test uréase

Objectif et principe :

Objectif du test : Déterminer la capacité des micro-organismes à hydrolyser l'urée grâce à l'enzyme uréase (Nijris, 2022).

Principe :

L'uréase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'urée en produits finaux alcalins, tels que l'ammoniac. (Nijris, 2022).

Technique :

Inoculation : Ensemencer le milieu uréique avec l'isolat bactérienne à analyser

Matériel et méthode

Incubation : Maintenir à 45°C pendant 24 heures (Nijris, 2022).

Lecture :

Test positif : Apparition d'une couleur rose

Test négatif : Absence de coloration rose (Nijris, 2022).

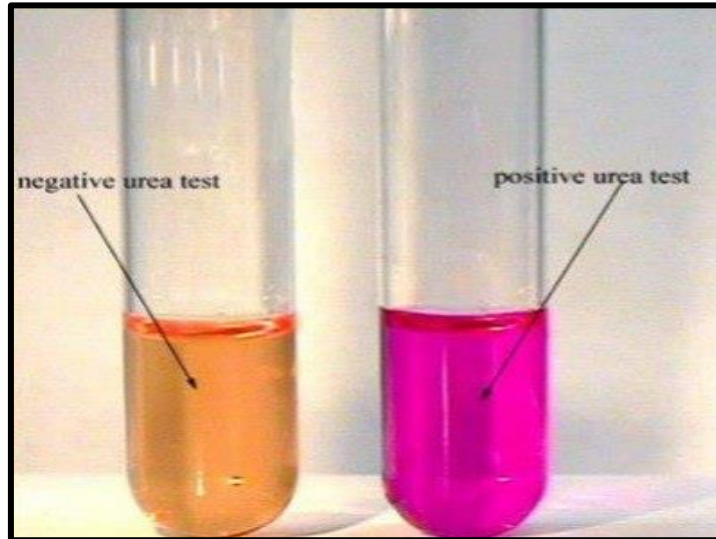


Figure 11 : Résultats du test d'urée (Nijris, 2022).

4.9. Test mannitol mobilité

Objectif et principe :

Évaluer simultanément la motilité et la fermentation du mannitol.

Certaines bactéries mobiles peuvent utiliser le mannitol comme substrat énergétique, entraînant une acidification du milieu (Nijris, 2022).

Technique :

Inoculation : Ensemencer le milieu urée par piqûre profonde à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.

Incubation : Incuber le tube à 45°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture des résultats : Observer le changement de couleur du milieu après incubation. (Nijris, 2022).

Lecture :

Mannitol positif. : virage du milieu au jaune (acidification)

-Mannitol négatif : Le milieu garde sa couleur initiale (rouge)

-Culture dans toute la gélose (trouble) et diffusion à partir de la pique : bactérie mobile. (Nijris, 2022).

4.10 .Test de sporulation

Principe :

Cette méthode visualise les endospores bactériennes, structures dormantes ultra-résistantes dotées :

D'une paroi sporale multicouche

D'un processus de différenciation à partir de cellules végétatives

De propriétés de résistance extrême aux :

Rayonnements ionisants

Désinfectants chimiques

Stress physico-chimiques (Nijris, 2022).

Technique :

Les bactéries doivent être maintenues en incubation pendant une durée de sept jours pour favoriser le processus de sporulation (Guiraud, 1998).

Confectionner un frottis bactérien sur une lame

Fixer à l'aide de chaleur (flamme)

Incorporer du vert de malachite pendant un quart d'heure

Laver à l'eau distillée

Appliquer une contre-coloration avec de la safranine durant 10 secondes

Laver à l'eau distillée

Examiner au microscope (objectif $\times 100$)(Guiraud, 1998).

Lecture

La spores apparaît en vert

Les cellules végétales en rose (Guiraud, 1998).

4.11. Test de hydrolyse de gélatine

Principe :

Test d'hydrolyse de la gélatine détecte la capacité des bactéries à produire des gélatinases (Dela et Torres,2012).

Technique :

Les bactéries sont inoculées et incubées à 45 °C pendant 48 heures.

Les tubes sont refroidis au réfrigérateur (4 °C) pendant 30 minutes (Dela et Torres,2012).

Lecture :

Test positif : Le milieu gélatiné reste liquide.

Test négatif : Le milieu gélatiné se solidifie (Dela et Torres,2012).

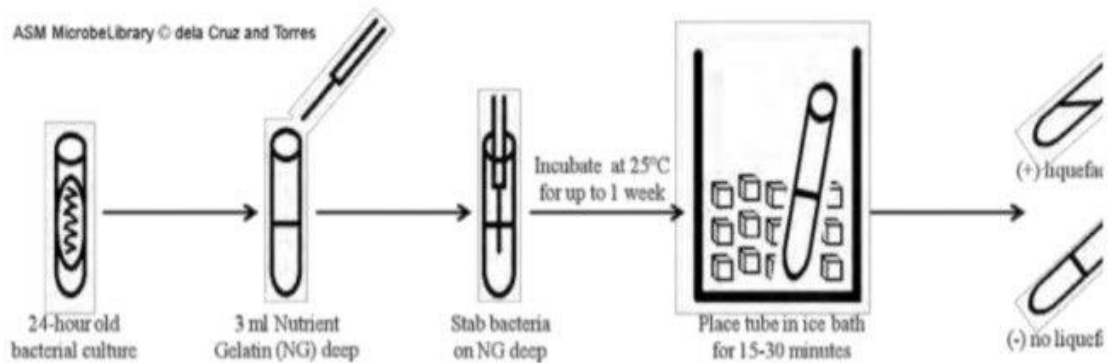


Figure 12 : Protocole et résultats de TestGelatinHydrolysis (Dela et Torres,2012).

4.12. Test de type respiratoire

Technique :

Pour déterminer le type respiratoire, on utilise la gélose viande foie. Ce milieu est d'abord régénéré au bain-marie, puis refroidi jusqu'à atteindre 45°C avant d'être versé dans des tubes à essai préalablement stérilisés. L'inoculation des tubes se fait ensuite à l'aide d'une pipette

Matériel et méthode

Pasteur. Les échantillons ainsi préparés sont placés à incuber à une température de 45°C pendant une période de 24 heures.(Tifrit, 2016).

Lecture :

Aérobies stricts: croissent uniquement dans la zone superficielle (oxygénée) .

Anaérobies stricts: croissent uniquement en profondeur (sans oxygène).

Aérobies-anaérobies facultatifs: se développent à tous les niveaux du milieu.

Micro-aérophiles: forment un anneau dans la zone intermédiaire entre aérobiose et anaérobiose.

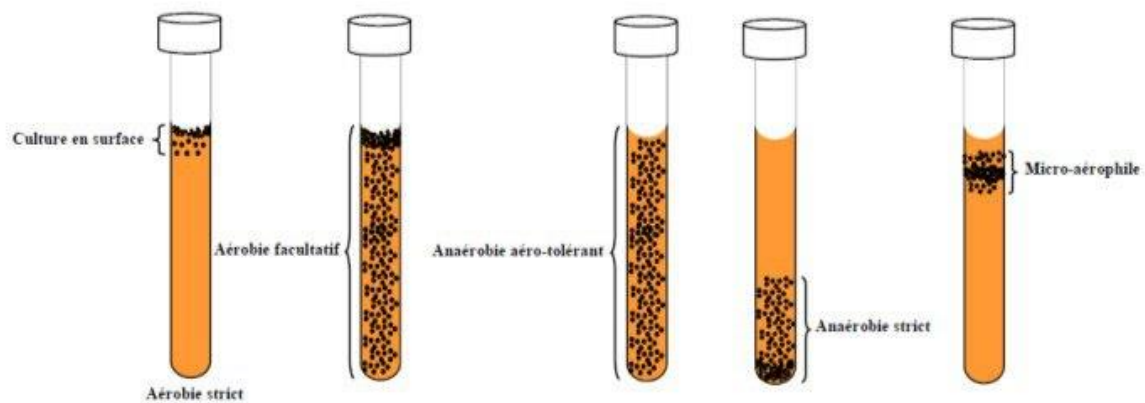


Figure 13 : Résultats de test type respiratoire (Tifrit, 2016).

4.13. Test Hydrolyse de la lécithine

Principe :

L'activité lécithinasiq ue peut être mise en évidence à l'aide d'un milieu contenant du jaune d'œuf.(Guiraud, 1998).

Technique :

Inoculations ponctuelles sur un milieu de culture nutritif enrichi avec 10% de jaune d'œuf stérilisé ajouté au GN, suivi d'une période d'incubation de 24 heures à une température de 45°C.(Faffani, 2015).

Lecture :

La dégradation de la lécithine est mise en évidence par l'apparition d'une zone plus claire autour des colonies bactériennes et par la formation d'un halo de précipitation dans le milieu contenant le jaune d'œuf (**Faffani, 2015**).

4.14 Test de croissance à différentes T°

Les isolats bactériens sont ensemencés par stries simples sur un milieu GN, puis incubés à différentes températures : 4 °C, 28 °C, 45 °C, 55 °C et 80 °C. L'incubation dure initialement 24 heures, avec un suivi quotidien permettant d'observer l'évolution de la croissance. Pour certaines températures (4 °C, 28 °C, 45 °C, 55 °C et 80 °C), la durée d'incubation peut être 72 heures afin de mieux évaluer la croissance bactérienne. (**Guiraud, 1998**).

4.15. Identification biochimique par la Galerie api 20^E

Principe :

La galerie API 20E a été utilisée pour l'identification biochimique des souches, en raison de sa disponibilité et de sa pertinence.

La galerie API 20E comprend 20 microtubes renfermant des substrats déshydratés. L'inoculation est réalisée à l'aide d'une suspension bactérienne, permettant la réhydratation des milieux. Durant l'incubation, les réactions métaboliques engendrent des changements de couleur, soit spontanés, soit nécessitant l'ajout de réactifs pour être visualisés. L'interprétation des résultats s'effectue à l'aide d'un tableau de lecture spécifique, tandis que l'identification finale repose sur un tableau d'identification dédié. (**Tifrit, 2016**).

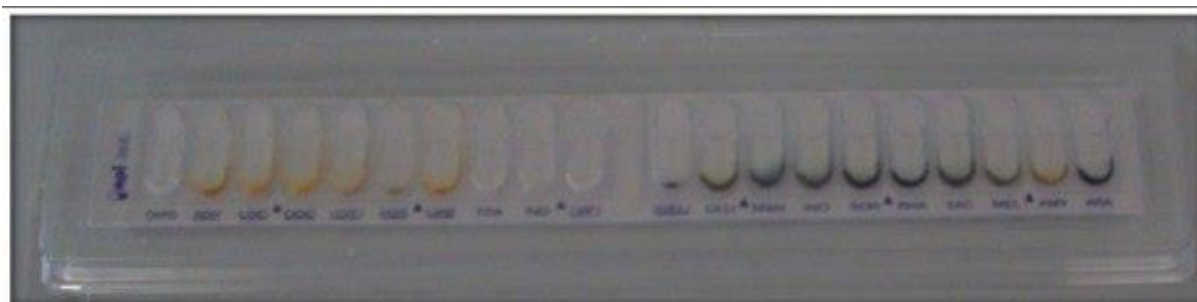


Figure 14 : Apparence de la galerie API 20 E dans son état initial, avant l'introduction des suspensions bactériennes (**Tifrit, 2016**).

Technique

Matériel et méthode

Préparation de la galerie : Assembler le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation, puis remplir les cavités d'eau afin de maintenir une humidité optimale. Placer ensuite la galerie de manière stérile à l'intérieur de la boîte **(Tifrit, 2016)**.

Préparation de l'inoculum : Préparer une suspension bactérienne en utilisant soit un tube de Suspension Medium, soit de l'eau distillée stérile. Ajuster la turbidité à une densité légère en prélevant une colonie isolée provenant d'une gélose de culture **(Tifrit, 2016)**.

Inoculation de la galerie : Pour préparer la galerie d'identification, introduisez la suspension bactérienne dans les tubes et cupules des tests CIT, VP et GEL. Pour les autres tests, remplissez uniquement les tubes. Afin de créer des conditions anaérobies pour les tests ADH, LDC, ODC, URE et H₂S, ajoutez une couche d'huile de paraffine dans leurs cupules respectives. Une fois la préparation terminée, fermez la boîte d'incubation et placez-la à une température de 45°C pour une durée de 18 à 24 heures **(Tifrit, 2016)**.

Lecture :

Une fois la période d'incubation terminée, il est nécessaire d'interpréter les résultats de la galerie en consultant le Tableau de Lecture fourni.**(Tifrit, 2016)**.

4.16. Test de sensibilité aux antibiotiques :

Principe :

L'antibiogramme permet d'évaluer la sensibilité d'une bactérie aux antibiotiques. Il a été réalisé selon la méthode de diffusion en milieu gélosé, également appelée méthode des disques. Cette technique, connue sous le nom de méthode de Kirby-Bauer, est recommandée par le NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) **.(Debabza, 2015)**.

Technique :

Les milieux gélosés MH ont été ensemencés à l'aide d'un écouvillon prélevé à partir d'une boîte de Pétri contenant les bactéries à tester. Les disques imprégnés d'antibiotiques ont ensuite été déposés sur la surface de la gélose MH à l'aide d'une pince stérilisée par flambage. Les antibiotiques évalués incluaient : Ticarcilline (Tic 75 µg), Ticarcilline + acide clavulanique (TTc 85 µg), Acide fusidique (FC 10 µg), Oxacilline (Ox 1 µg), Céfoxitine (N 30 µg), néomycine (Cx 30 µg), . Les boîtes ont ensuite été incubées entre 18 et 24 heures à une température de 45 °C.

Lecture :

Une zone d'inhibition de la croissance se forme autour du disque et est mesurée à l'aide d'une règle graduée en millimètres. La mesure obtenue est ensuite confrontée aux valeurs de référence établies pour l'antibiotique testé. Cette comparaison permet de déterminer le degré de sensibilité du microorganisme, qui peut être classé en trois catégories : sensible, intermédiaire ou résistant. (Nijris, 2022).

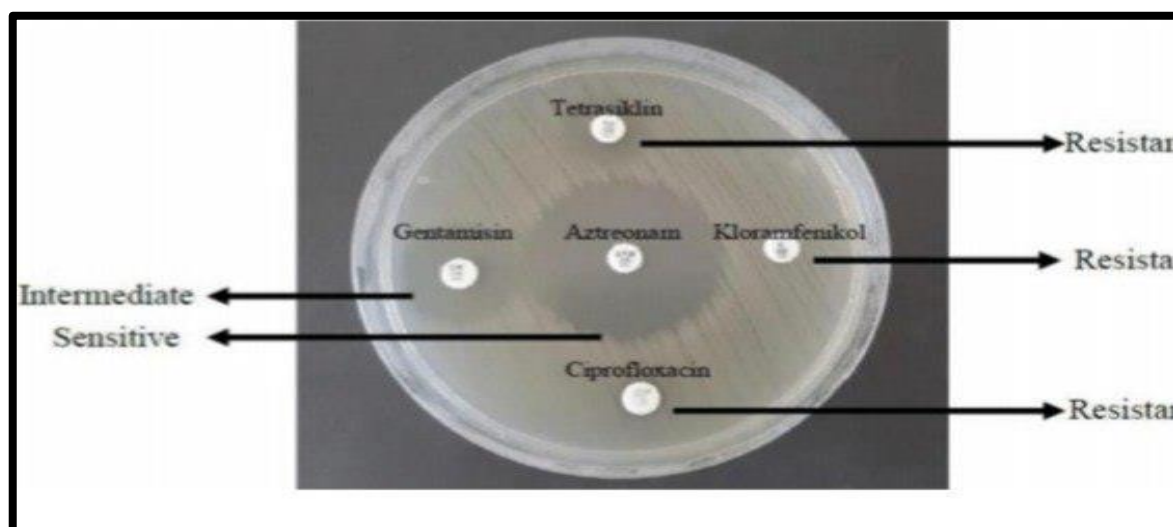


Figure15 : Résultats de. Test de sensibilité aux antibiotiques (Nijris, 2022).

5. Etude de l'activité enzymatique

5.1. Activité amylolytique

La mise en évidence de la production d'amylase s'effectue sur une gélose nutritive supplémentée avec 0,3 % d'amidon soluble. Les souches bactériennes sont ensemencées par touches à la surface de boîtes de Pétri. Après une incubation de 48 heures à 45 °C, la détection de l'activité enzymatique est réalisée en inondant les boîtes de Pétri, (Gopinath et al. 2017).

L'apparition d'un halo clair autour des colonies après une coloration au lugol témoigne de la capacité des bactéries à hydrolyser l'amidon, tandis que l'absence d'un halo indique une absence d'activité enzymatique vis-à-vis de l'amidon (Izyan et al., 2020).

5.2 Activité cellulosique

Pour le criblage primaire des bactéries capables d'hydrolyser la cellulose, les souches sont cultivées sur un milieu gélosé minimal enrichi avec 1 % de carboxyméthyl cellulose (CMC).

Après une incubation de 48 heures à 45 °C, L'apparition d'un halo clair autour des colonies après l'ajoute de lugol traduit la production de cellulase extracellulaire (**Saini et al., 2017**).

5.3. Activité lipolytique

La détection de la production de lipases et d'estérases repose initialement sur un test de précipitation réalisé à l'aide d'un milieu de culture de base supplémenté en Tween 80. Cette méthode repose sur le principe de formation de sels de calcium insolubles. En effet, l'hydrolyse du Tween libère des acides gras qui se combinent avec le calcium présent dans le milieu, entraînant la formation de cristaux insolubles autour du site d'inoculation.

Le Tween 80 est spécifiquement utilisé pour mettre en évidence l'activité lipasique, car il contient des esters d'acide oléique.

Les bactéries à analyser sontensemencées sur un milieu de culture contenant 10 g de peptone, 5 g de NaCl, 0,1 g de CaCl₂·2H₂O, 20 g d'agar et 10 ml de Tween 80 (v/v). Après une incubation de 48 heures à 45 °C, l'apparition d'un précipité blanc autour des colonies témoigne de l'activité lipasique ou estérasique des souches testées (**Ramnath et al., 2017**).

5.4. Activité protéolytique

Afin d'évaluer l'activité protéolytique, les souches bactériennes à tester sontensemencées par touches sur une gélose nutritive au lait écrémé, de manière à obtenir des colonies bien isolées. L'incubation est réalisée à 45°C pendant 24 heures. À l'issue de cette période, l'activité protéolytique est mise en évidence par un test simple reposant sur l'observation de zones d'hydrolyse, visibles sous forme de halos clairs autour des colonies. (**Kerouaz, 2021**).

6. Production de protéase en milieu solide FMS

6.1. Production de protease par caséine

6.1.1. Préparation du milieu de fermentation

La production de protéase a été réalisée dans des flacons contenant chacun 5 grammes de caséine servant de substrat a été stériliser a l'autoclave. Un milieu nutritif spécifique a été ajouté, composé (en g/L) de citrate trisodique (10), de peptone (10), de MgSO₄ (0,5), de KH₂PO₄ (0,3) et de KCl (0,3), avec un pH ajusté entre 7 et 9,1. Deux gouttes de Tween 80 ont été incorporées comme agent émulsifiant. Pour atteindre l'humidité souhaitée, 64 % d'eau distillée a été ajoutée. Le mélange contenu dans les flacons a été homogénéisé avec soin, puis stérilisé à l'autoclave 121 °C pendant 20 minutes. Après cette étape, les Erlenmeyers de 250 mL ont été

Matériel et méthode

recouverts de papier aluminium, puis soumis à une stérilisation complémentaire dans un four pasteur. Une fois stérilisés et refroidis, ils étaient prêts pour l'étape suivante

6.1.2. Ensemencement des milieux de fermentation

Chaque Erlenmeyer a été inoculé avec le milieu de culture ainsi que 2 mL de suspension bactérienne (Do pour b1: 1.025 et pour b2: 1). Après un mélange soigneux pour assurer une répartition homogène, les flacons ont été placés dans une étuve et incubés à 45 °C pendant une durée de 72 heures.

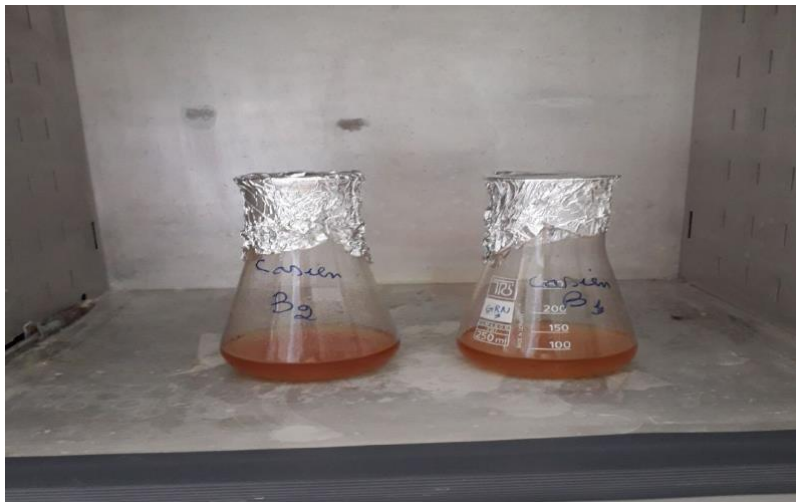


Figure 16 : Production de protéase par caséine

6.1.3. Extraction enzymatique

À l'issue de la fermentation, le contenu de chaque flacon est homogénéisé à l'aide d'un mélangeur pendant 5 minutes. Le mélange obtenu est ensuite centrifugé à 1500 tours par minute pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite soigneusement récupéré pour les analyses ultérieures.

6.1.4. Technique des puits

Après solidification de la gélose nutritive additionnée de lait écrémé, des puits de 6 mm de diamètre ont été réalisés de manière aseptique à l'aide de l'extrémité plane de pipettes Pasteur stériles. Un volume de 50 μ L de surnageant a ensuite été déposé dans chaque puits. L'incubation a été effectuée à 45 °C pendant deux heures, après quoi les résultats ont été observés.

6.1.5. Technique de disque

Des disques de 9 mm de diamètre ont été déposés de manière stérile à l'aide d'une pince sur la surface de la gélose nutritive enrichie en lait écrémé. Chaque disque a été imprégné avec

10 μ L de surnageant. Les boîtes ont ensuite été incubées à 45 °C pendant une durée de deux heures.

6.2. Production de protéase par lait écrémé

6.2.1. Préparation du milieu de fermentation

La production de protéase a été réalisée dans des flacons contenant chacun 5 ml lait écrémé stérile servant de substrat. Un milieu nutritif spécifique a été ajouté, composé (en g/L) de citrate trisodique (10), de peptone (10), de $MgSO_4$ (0,5), de KH_2PO_4 (0,3) et de KCl (0,3), avec un pH ajusté entre 7 et 9,1. Deux gouttes de Tween 80 ont été incorporées comme agent émulsifiant. Pour atteindre l'humidité souhaitée, 64 % d'eau distillée a été ajoutée. Le mélange contenu dans les flacons a été homogénéisé avec soin, puis stérilisé à 121 °C pendant 20 minutes. Après cette étape, les Erlenmeyers de 250 mL ont été recouverts de papier aluminium, puis soumis à une stérilisation complémentaire dans un four pasteur. Une fois stérilisés et refroidis, ils étaient prêts pour l'étape suivante .

6.2.2. Ensemencement des milieux de fermentation

Chaque Erlenmeyer a été inoculé avec le milieu de culture ainsi que 2 mL de suspension bactérienne (Do pour b1: 1.025 et pour b2: 1). Après un mélange soigneux pour assurer une répartition homogène, les flacons ont été placés dans une étuve et incubés à 45 °C pendant une durée de 72 heures

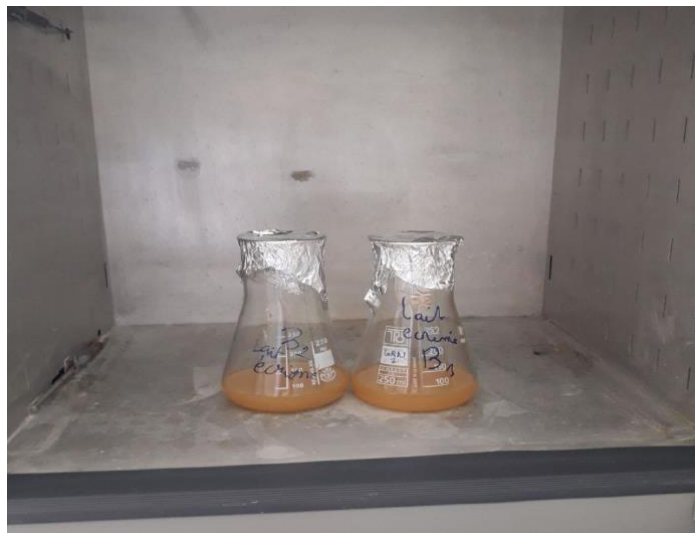


Figure 17 : Production de protéase par lait écrémé .

6.2.3. Extraction enzymatique

À l'issue de la fermentation, le contenu de chaque flacon est homogénéisé à l'aide d'un mélangeur pendant 5 minutes. Le mélange obtenu est ensuite centrifugé à 1500 tours par minute pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite soigneusement récupéré pour les analyses ultérieures.

6.2.4 .Technique des puits

Après solidification de la gélose nutritive additionnée de lait écrémé, des puits de 6 mm de diamètre ont été réalisés de manière aseptique à l'aide de l'extrémité plane de pipettes Pasteur stériles. Un volume de 50 µL de surnageant a ensuite été déposé dans chaque puits. L'incubation a été effectuée à 45 °C pendant deux heures, après quoi les résultats ont été observés

6.2.5. Technique de disque

Des disques de 9 mm de diamètre ont été déposés de manière stérile à l'aide d'une pince sur la surface de la gélose nutritive enrichie en lait écrémé. Chaque disque a été imprégné avec 10 µL de surnageant. Les boîtes ont ensuite été incubées à 45 °C pendant une durée de deux heures.

7. Evaluation de l'efficacité du lavage

L'applicabilité des protéases en association avec une solution détergente (pré-formulée par des chimistes et contenant 1,8 g de sel pour 100 mL de solution) a été évaluée sur des échantillons de tissu en coton tachés de sang. Ces cotant ont été placés dans des béchers contenant différentes solutions de lavage :

Eau distillée seule : 100 mL d'eau distillée.

Détergent seul : 100 mL de solution détergente.

Détergent + extrait enzymatique (caséine, souche B1) : 100 mL de détergent + 1 mL d'extrait enzymatique obtenu à partir d'un milieu contenant de la caséine, issu de la souche B1.

Détergent + extrait enzymatique (caséine, souche B2) : 100 mL de détergent + 1 mL d'extrait enzymatique provenant de la souche B2 cultivée sur un milieu à base de caséine.

Détergent + extrait enzymatique (lait écrémé, souche B1) : 100 mL de détergent + 1 mL d'extrait enzymatique préparé à partir d'un milieu contenant du lait écrémé, issu de la souche B1.

Matériel et méthode

Détergent + extrait enzymatique (lait écrémé, souche B2) : 100 mL de détergent + 1 mL d'extrait enzymatique obtenu à partir d'un milieu au lait écrémé, cultivé avec la souche B2.

Après 15min, les tissus ont été soigneusement rincés, séchés, puis examinés à l'œil nu afin d'évaluer l'efficacité des enzymes dans l'élimination des taches,

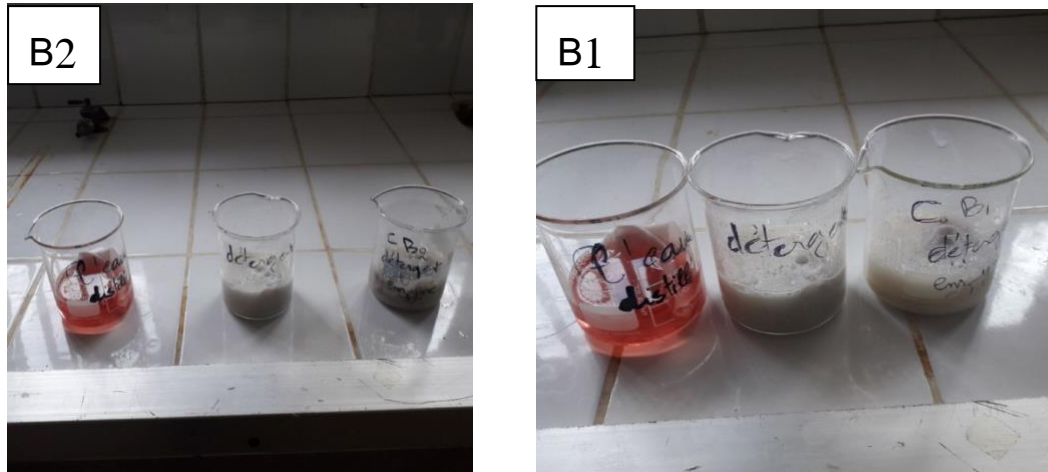


Figure 18 : Analyse de la performance du lavage par enzyme protéase (milieu caséine)



Figure 19 : Analyse de la performance du lavage par enzyme protéase (milieu lait écrémé)

Résultats et discussion

1. Résultat de l'identification

1.1. Identification Macroscopique des isolats bactériens

L'identification macroscopique des bactéries a été réalisée après leur culture sur un milieu GN. Le tableau 05 présente les caractéristiques macroscopiques observées au niveau des colonies, telles que la forme, l'aspect, la couleur, les contours et la taille, entre autres

Tableau 5 : Caractérisation macroscopique des isolats bactériens.

| Milieu | Isolats | L'aspect des colonies |
|--------|---------|---|
| GN | B1 | Translucide a blanche ; Circulaire, Plate ; Crémeuse ; Moyenne ; irrégulier |
| GN | B2 | Jaunatre pale à crème ; Lisse et brillante ; Circulaire ; Bombés. Crémeuse ; Moyenne ; Opaque. Régulier |

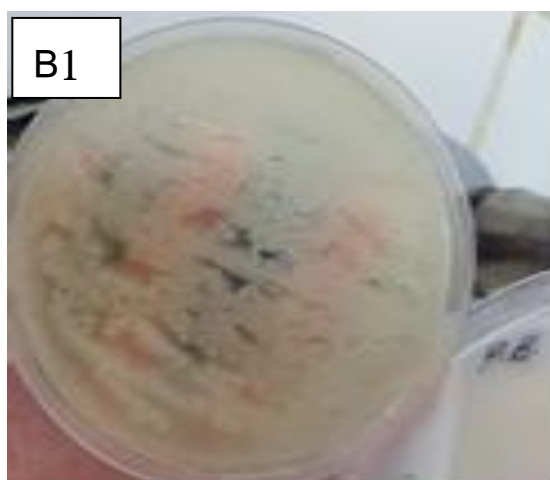
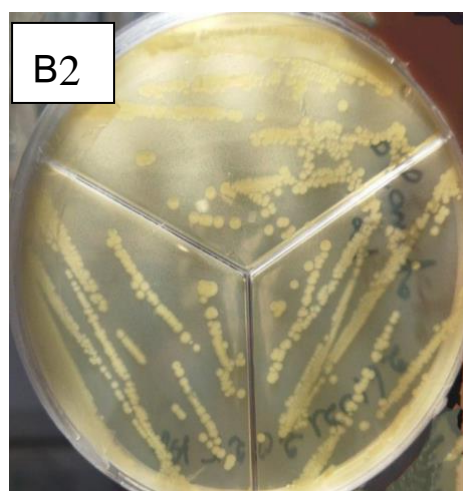


Figure20 : Aspect macroscopique des colonies sur GN

1.2 Identification microscopique

Ce tableau résume les résultats de l'observation des bactéries à l'état frais et après coloration de Gram.

Tableau 6 : présente les observations microscopiques des isolats bactériens, incluant l'examen à l'état frais (mobilité) ainsi que les résultats de la coloration de Gram.

| Milieu | Isolats | L'état frais | Coloration de Gram |
|--------|---------|-------------------|---|
| GN | B1 | Bacille immobile. | Bacilles de couleur violette (Gram+) |
| GN | B2 | Bacille immobile. | Bacilles de couleur violette (Gram+) |

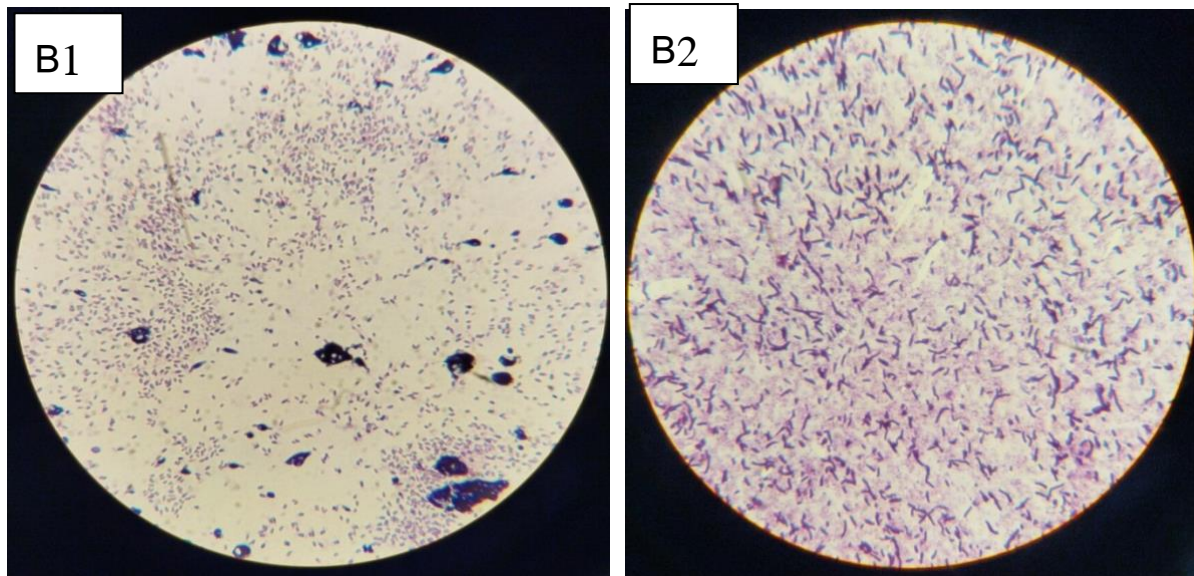


Figure 21 : Visualisation au microscope des isolats bactériennes étudiées après coloration de Gram (grossissement X100)

2. Résultats de Galerie Classique

Ce tableau indique la présence ou l'absence des enzymes catalase et oxydase chez les isolats bactériens,

Tableau 7 : résultat de test catalase et oxydase

| Isolats | Catalase | Oxydase |
|---------|----------|---------|
| B1 | + | - |
| B2 | - | - |

(+) : résultat positive

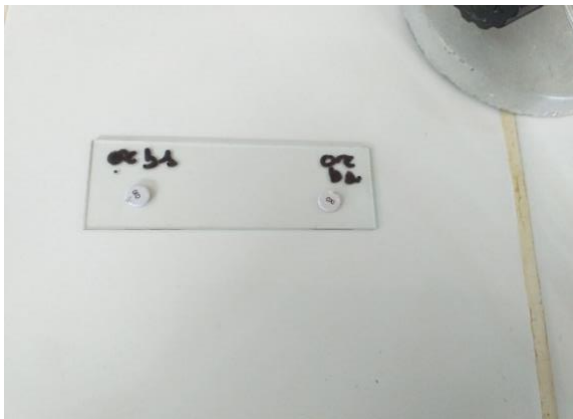
(-) : résultat négative

2.1. Résultat de Test Catalase

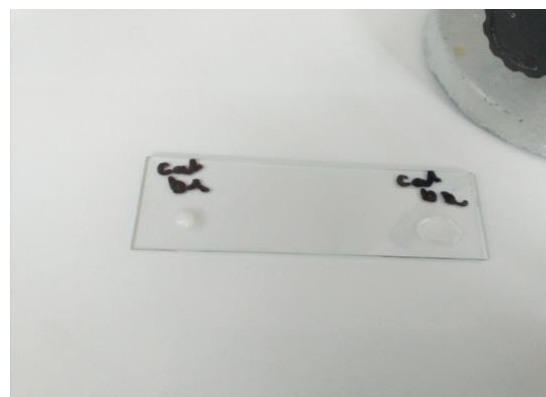
L'apparition de bulles gazeuses suite à l'ajout de H₂O₂ indique une réaction positive au test de la catalase, ce qui signifie que les deux souches bactériennes produisent l'enzyme catalase (Bouras, 2018).

2.2. Résultat de Test oxydase

Le test de l'oxydase réalisé sur les deux isolats bactériennes a révélé une réaction négative, comme en témoigne l'absence de coloration après contact avec le disque imprégné de diméthyl-para-phénylènediamine. Cela indique que ces bactéries ne produisent pas l'enzyme cytochrome c oxydase (Bouras, 2018).



résultat de test Oxydase



résultat de test catalase

Figure 22 : résultat de test Catalase et oxydase

2.3 .Résultat de test Indole

Ce tableau examine l'aptitude des bactéries à synthétiser de l'indole en dégradant le tryptophane .

Tableau 8 : résultat de test indole.

| Isolats | Indole |
|---------|--------|
| B1 | - |
| B2 | - |

(+) : positive

(-) : Négative

Le test d'indole réalisé sur l'échantillon s'est révélé négatif. Les indications B1 et B2

Confirment l'absence de production d'indole (Nijris, 2022).

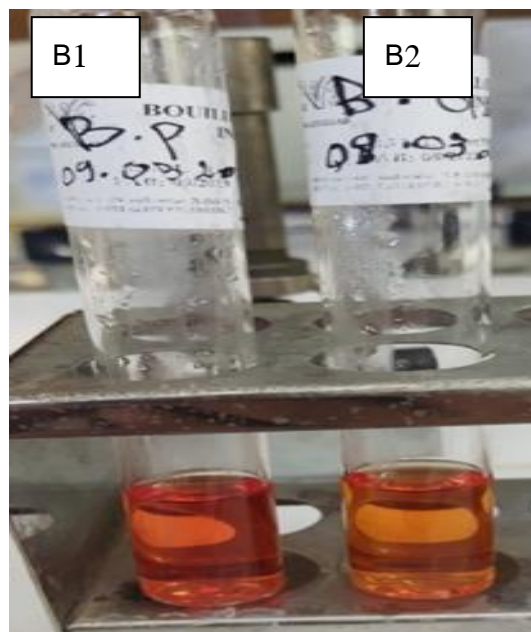


Figure 23 : résultats de test indole

2.4. Résultats de test RM et VP

Ce tableau présente les résultats obtenus aux tests du rouge de méthyle (RM) et de Voges-Proskauer (VP), utilisés pour identifier la voie fermentaire privilégiée par les bactéries au cours de la dégradation du glucose.

Tableau 9 : résultats de test RM et VP .

| Isolats | RM | VP |
|---------|-----|-----|
| B1 | (+) | (-) |
| B2 | (+) | (-) |

résultats négative :(-) résultats positive : (+) VP : Vogues Proskauer RM : rouge méthyle

Dans le test VP, l'absence de coloration rouge indique que l'acétoïne n'est pas produite, ce qui signifie que le glucose n'est pas fermenté via la voie butylène-glycolique. Par conséquent, les deux isolats sont Considérées comme VP négatives (Nijris, 2022).

La coloration rouge observée chez les deux bactéries après l'ajout de rouge de méthyle indique un résultat positif (RM+). Cela traduit la capacité de ces isolats à réaliser une fermentation mixte produisant des acides (Nijris, 2022).



Figure 24 : résultats de test VP



Figure 25 : résultats de test RM

2.5. Résultat Test d'utilisation du citrate

Ce tableau présente les résultats obtenus au test du citrate de Simmons, utilisé pour déterminer si les isolats bactériens peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone dans leur métabolisme.

Tableau 10 : résultat Test d'utilisation du citrate

| Isolats | Citrate de Simmons |
|-----------|--------------------|
| B1 | - |
| B2 | - |

(-) : Négative

On observe dans le milieu citrate de Simmons une absence de changement de couleur pour toutes les isolats étudiées(B1) et (B2) (Test négatif),

C'est à dire la bactérie n'utilise pas le citrate comme seule source de carbone (citrate -) (Nijris, 2022).



Figure 26 : Résulta de test citrate de Simmons

2.6. Résultat de test nitrate réductase

Ce tableau examine l'aptitude des isolats bactériens à transformer les nitrates en nitrites ou en azote gazeux par l'action de l'enzyme nitrate réductase.

Tableau 11 : résultat de test nitrate réductase

| Isolats | Nitrate |
|---------|---------|
| B1 | + |
| B2 | - |

(+): positive

(-) : Négative

Pour la bactérie B1 La coloration rouge du milieu indique la présence de nitrates, ce qui révèle que la bactérie possède une nitrate réductase (NR+)

Concernant la bactérie B2, l'aspect du milieu ne change pas initialement. De ce fait, on y ajoute de la poudre de zinc, qui agit de manière similaire à la nitrate réductase en réduisant les nitrates. L'apparition d'une coloration rouge après l'ajout du zinc indique un résultat négatif, ce qui signifie que les nitrates (NO_3^-), encore présents, ont été réduits en nitrites (NO_2^-) par le zinc. Cette réaction, révélée par les réactifs, montre qu'aucune réduction des nitrates n'a été effectuée auparavant par la bactérie.

Par conséquent, celle-ci ne possède pas de nitrate réductase (NR⁻) (Nijris, 2022).



Figure 27 : résultat de test nitrate réductase

2.7. Résultat de test uréase

Ce tableau indique l'absence ou présent de l'enzyme uréase

Tableau 12 : résultat de test uréase

| Isolats | Uréase |
|---------|--------|
| B1 | - |
| B2 | - |

(-): Négative

Les deux isolats se sont révélés négatives au test de l'uréase, ce qui indique qu'elles ne produisent pas cette enzyme.



Figure 28 : résultat de test uréase

2.8. Résultat de Test mannitol mobilité

Ce tableau combine deux tests : la fermentation du mannitol et la mobilité bactérienne.

Tableau 13 : résultat de Test mannitol mobilité

| Isolats | Mannitol mobilité |
|-----------|----------------------------|
| B1 | Mannitol positive immobile |
| B2 | Mannitol négatif immobile |

Le milieu utilisé est une gélose semi-solide contenant du mannitol, un polyol dérivé du mannose, ainsi qu'un indicateur de pH, le rouge de phénol. La souche B1 est mannitol positive : elle fermente le mannitol, entraînant une acidification du milieu, ce qui provoque un changement de couleur de l'indicateur vers le jaune.

L'isolat B2 est mannitol négative : elle ne fermente pas le mannitol, donc aucune acidification ne se produit et le milieu conserve sa couleur rouge d'origine. Ce milieu permet également d'évaluer la mobilité bactérienne. Les deux isolats sont immobiles (mobilité négative), leur croissance étant limitée à la ligne de piqûre central



Figure 29 : Résultat de Test mannitol mobilité

2.9. Résultat de test de sporulation

Ce tableau rend compte de la capacité des isolats à former des endospores.

Tableau 14 : résultat de test de sporulation

| Isolats | Sporulation |
|-----------|-------------------|
| B1 | Présence de spore |
| B2 | Absente de spore |

Par observation au microscope présence de spore visible ronde Les spores apparaissent souvent vertes (colorées à la malachite verte qui signifie que l'isolat B1 sporulée

Par observation au microscope aucune spore détectée alors que la cellule est en rose qui signifie que l'isolat B2 non sporulée

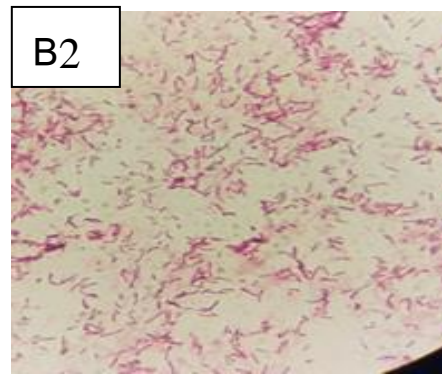
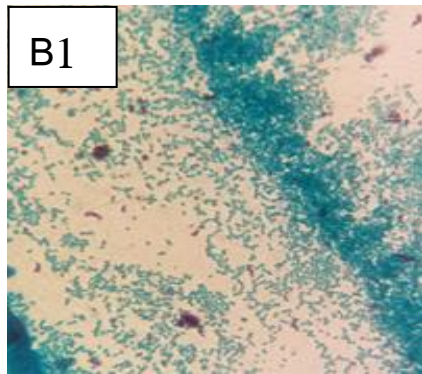


Figure 30 : Visualisation au microscope des isolats bactériennes étudiées après coloration de malachite verte (grossissement X100).

2.10. Résultat de Test hydrolyse de gélatine

Ce tableau identifier la présence ou l'absence de l'enzyme gélatinase

Tableau 15 : résultat de Test hydrolyse de gélatine

| isolats | Gélatine |
|---------|----------|
| B1 | + |
| B2 | + |

(+) : positive

Dans le test de gélatine, les deux isolats ont entraîné la liquéfaction du milieu, y compris après réfrigération, ce qui correspond à un résultat positif. Cela reflète une production active de gélatinase, démontrant la capacité des isolats à hydrolyser la gélatine.

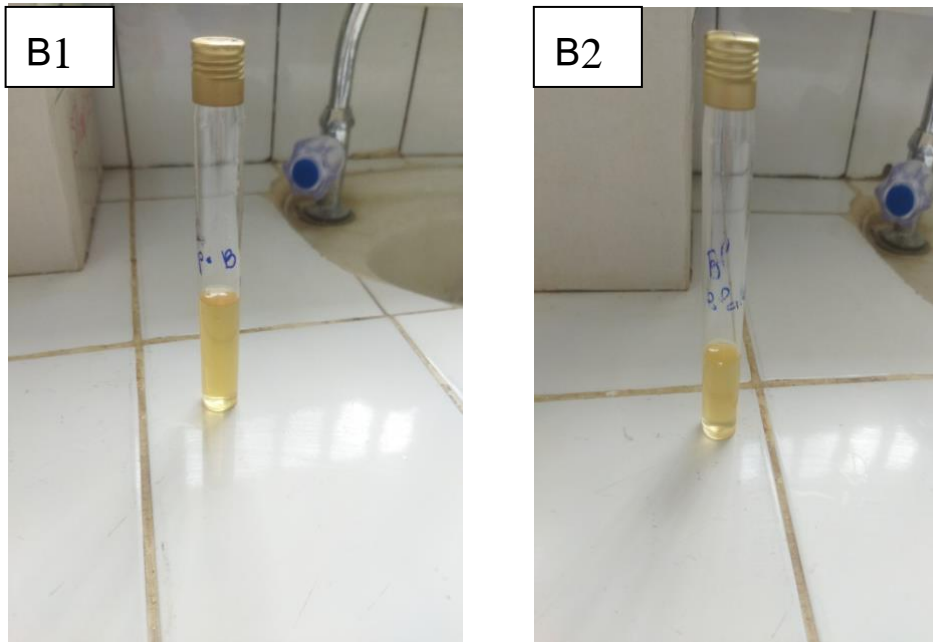


Figure 31 : résultat de Test hydrolyse de Gélatine

2.11. Résultat de Test de type respiratoire

Ce tableau identifie le mode respiratoire des isolats.

Tableau 16 : résultat de Test de type respiratoire

| Isolats | Type respiratoire |
|---------|-------------------|
| B1 | Aérobies stricte |
| B2 | Aérobies stricte |

L'observation des résultats sur le milieu viande-foie (VF) révèle que les deux isolats ne se développent que dans la zone supérieure des tubes. Cela indique qu'il s'agit de bactéries strictement aérobies.

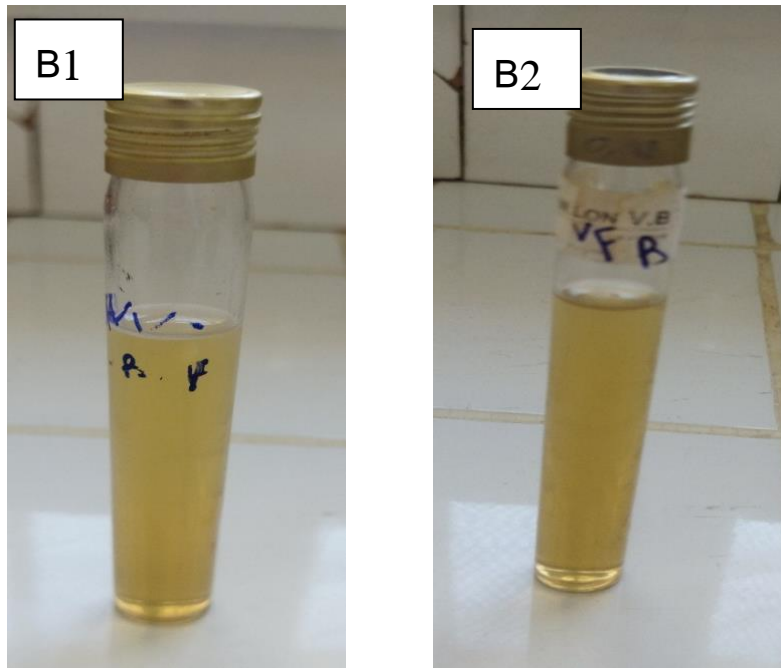


Figure 31 : Résultat de Test de type respiratoire

2.12. Résultat de Test Hydrolyse de la lécithine

Ce tableau identifier la présence ou l'absence de lécithinase

Tableau 17 : résultat de Test Hydrolyse de la Lécithine

| isolats | Lécithine |
|-----------|-----------|
| B1 | - |
| B2 | + |

(+) : positive

(-) : Négative

Lors du test à la lécithine, un halo opaque est visible autour des colonies bactériennes B2 cultivées sur gélose au jaune d'œuf. Ce résultat positif révèle que l'isolat analysée est capable de produire de enzyme lécithinase.

Pour l'isolat B1, aucune zone d'opacification n'a été détectée autour des colonies. Ce résultat négatif suggère que la lécithine n'a pas été hydrolysée, indiquant ainsi l'absence de production de Lécithinase par cette souche

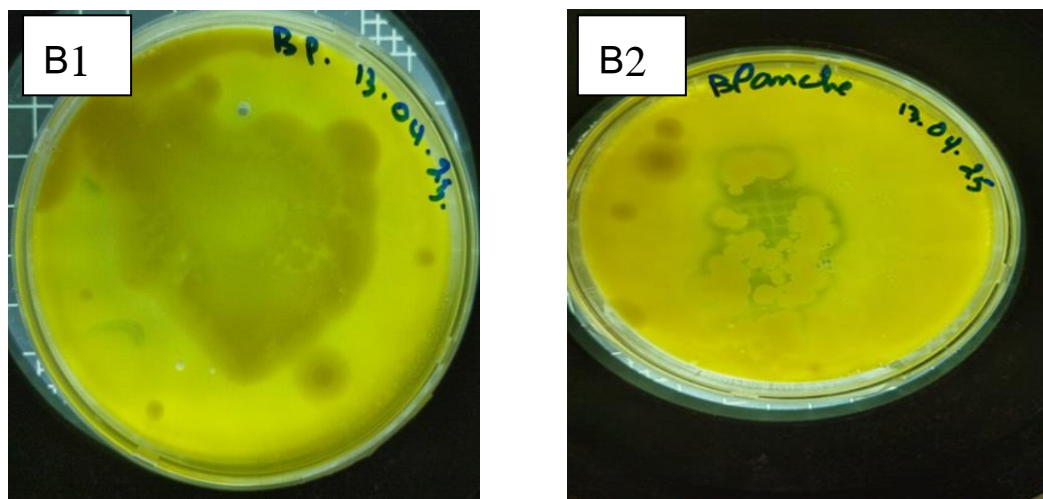


Figure 32 : résultat de Test Hydrolyse de la lécithine

2.13 Résultat de Test de croissance à différente température

Ce tableau explore la capacité de croissance des isolats à différentes températures.

Tableau 18 : résultat de Test de croissance à différente température

| isolats | 4°C | 28°C | 37°C | 45°C | 80°C |
|-----------|-------------------|-------------------|------------|------------|-------------------|
| B1 | Pas de croissance | Croissance | Croissance | Croissance | Pas de croissance |
| B2 | Pas de croissance | Pas de croissance | Croissance | Croissance | Pas de croissance |

L'isolat B1 se croissane dans la température idéale entre 28 °c et 45°C.

L'isolat B2 se croissane dans la température idéale 37°C et 45°C.

2.14. Galerie API 20 E

Identification par galerie API 20

L'identification des deux isolats bactériennes à l'aide de la galerie API 20 E a permis de révéler leurs principales caractéristiques biochimiques. »

Les résultats obtenus après incubation sont les suivants :

2.14.1 Isolat (B1)

Ce tableau présente le profil biochimique de l'isolat B1 selon le système API 20E.

Tableau 19 : résultat de la galerie API 20E de la souche (B1)

| | | | | | | |
|----------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tests | ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H2S |
| Résultat | - | - | - | - | - | - |
| Tests | URE | TDA | IND | VP | GEL | GLU |
| Résultat | - | + | - | - | + | - |
| Tests | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL |
| Résultat | + | - | - | - | - | - |
| Tests | AMY | ARA | OX | NO2 | | |
| Résultat | - | + | - | + | | |

Positif = (+)

Négatif = (-)



Figure 33 : résultat de la galerie API 20 E de l'isolat (B1)

2.14.2 Isolat (B2)

Ce tableau expose les caractéristiques biochimiques de l'isolat B2 obtenues à l'aide de la galerie API 20E, permettant d'identifier son profil métabolique.

Tableau 20 : Résultat de la galerie API 20E de l'isolat (B2).

| | | | | | | |
|----------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tests | ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H2S |
| Résultat | - | - | - | - | - | - |
| Tests | URE | TDA | IND | VP | GEL | GLU |
| Résultat | - | + | - | - | + | - |
| Tests | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL |
| Résultat | - | - | - | - | - | - |
| Tests | AMY | ARA | OX | NO2 | | |
| Résultat | - | + | - | - | | |

Positif = (+)

Négatif = (-)



Figure 34 : résultat de la galerie API 20 E de l'isolat (B2).

2.15. Résultat de l'antibiogramme

Ce tableau présente la réaction des deux isolats bactériens face à divers antibiotiques, permettant ainsi d'identifier leur profil de sensibilité ou de résistance aux agents antimicrobiens testés.

Tableau 21 : résultat de l'antibiogramme des isolats isolées.

| ATP I | Ticarcilline (Tic 75 µg), | Ticarcilline + acide clavulanique (TTc 85 µg), | Acide fusidique (FC 10 µg), | Oxacilline (Ox 1 µg) | Néomycine (N 30 µg), | céfoxitine (Cx 30 µg), |
|---------------------|---------------------------------|--|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|
| B1 | Sensible | Sensible | Sensible | Intermediare | Intermediare | Sensible |
| Diamètre de zone | 1.8 cm | 5.2 cm | 2.5 cm | 2 cm | 1.5 cm | 2.7 cm |
| B2 | Sensible | Sensible | Sensible | Sensible | Intermediare | Sensible |
| Diamètre de zone | 2.9 cm | 4.8 cm | 3.6 cm | 3.5 cm | 2.3 cm | 4.5 cm |

Atp : Antibiotique

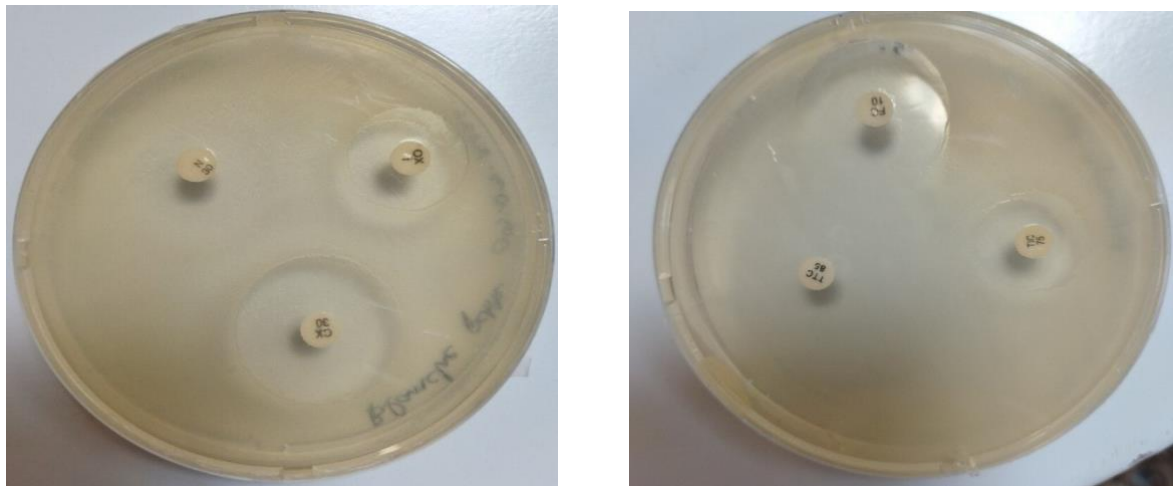


Figure 35 : résultat de l'antibiogramme de B1

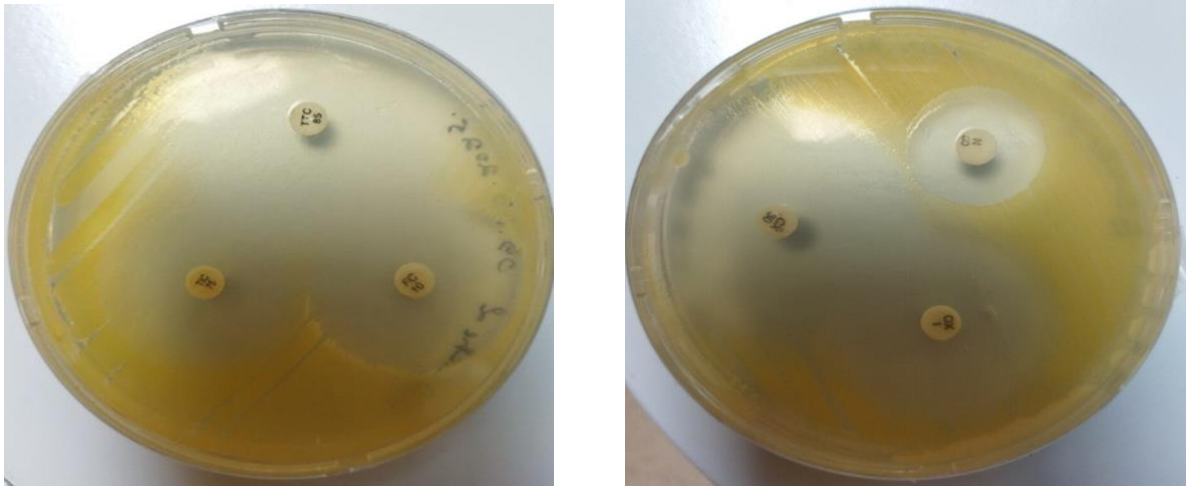


Figure 36 : résultat de l'antibiogramme de B2

3. Résultat de l'étude de l'activité enzymatique

Ce tableau met en évidence l'aptitude des souches bactériennes à synthétiser différentes enzymes extracellulaires, notamment des protéases, cellulases, amylases et lipases.

Tableau 22 : Zones d'hydrolyses des isolats bactériennes testées après 48 h d'incubation.

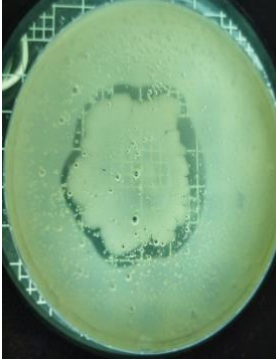

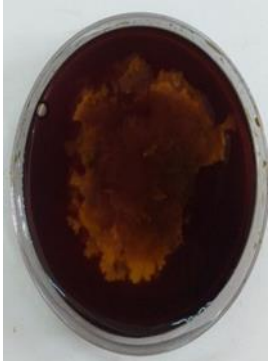
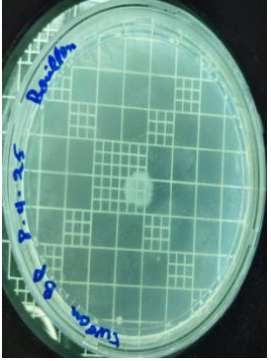
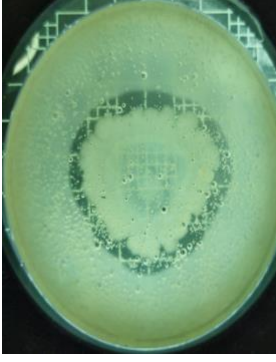

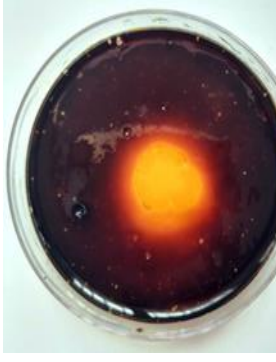
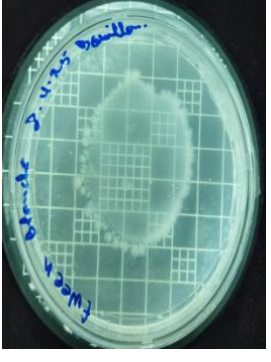
| Isolats | Protéase | Cellulase | Amylase | Lipase |
|---------|---|---|--|---|
| B1 |  |  |  |  |
| B2 |  |  |  |  |

Tableau 23 : Activités hydrolytiques des souches bactériennes après 48h d'incubation.

| Isolats | Protéase | Cellulase | Amylase | Lipase |
|---------|----------|-----------|---------|--------|
| B1 | + | - | - | - |
| B2 | + | - | + | - |

(+) : positive

(-) : Négative

Une évaluation des activités enzymatiques protéolytiques, amylolytiques, cellulolytiques et lipolitique a été menée. La détection de ces activités a été réalisée à l'aide de substrats spécifiques, à savoir : le lait écrémé, l'amidon, la carboxyméthylcellulose (CMC) et le Tween 80, utilisés respectivement pour chacune de ces activités.

3.1. Activité amylolytique

L'isolat B1 capable d'hydrolyser l'amidon, ce qui signifie que ce dernier possède d' amylase

L'isolat B2 sont incapables d'hydrolyser l'amidon, ce qui signifie que ces Ce dernier ne possède pas d'amylase.

3.2. Activité cellulosique

Selon les résultats des cultures présentés dans les tableaux 07 et 08, les isolats bactériennes B1 et B2 ne montrent aucune capacité à dégrader la carboxyméthylcellulose (CMC)

3.3. Activité lipolytique.

Il n'existe aucun isolat capable de dégrader le Tween 80, ce qui signifie que les deux isolats ne Possède pas lipase.

3.4. Activité protéolytique

D'après les tableaux 22 et 23, l'ensemble des isolats présentent une activité protéasique. Cette enzyme est révélée par l'apparition d'un halo clair entourant les colonies.

4. Production de protéase

4.1 .Production de protéase par caséine

L'activité hydrolytique vis-à-vis de la caséine a été évaluée après une fermentation de 72 heures à 45 °C. À l'issue de cette période, les cultures ont été centrifugées à 1500 tours par

minute pendant 10 minutes. Les surnageants récupérés ont ensuite été utilisés pour tester l'activité protéolytique, en appliquant à la fois la méthode des puits et celle des disques.

4.1.1. Méthode de puits

Ce tableau 24 mesure l'activité protéasique des extraits bactériens en utilisant la méthode des puits sur un milieu gélosé contenant de la caséine, à travers l'observation des zones d'hydrolyse formées autour des puits.

Tableau 24 : représentent les Diamètre des Zone par méthode des puits

| Souche | Diamètre de zone |
|--------|------------------|
| B1 | 1.6 cm |
| B2 | 1.5cm |

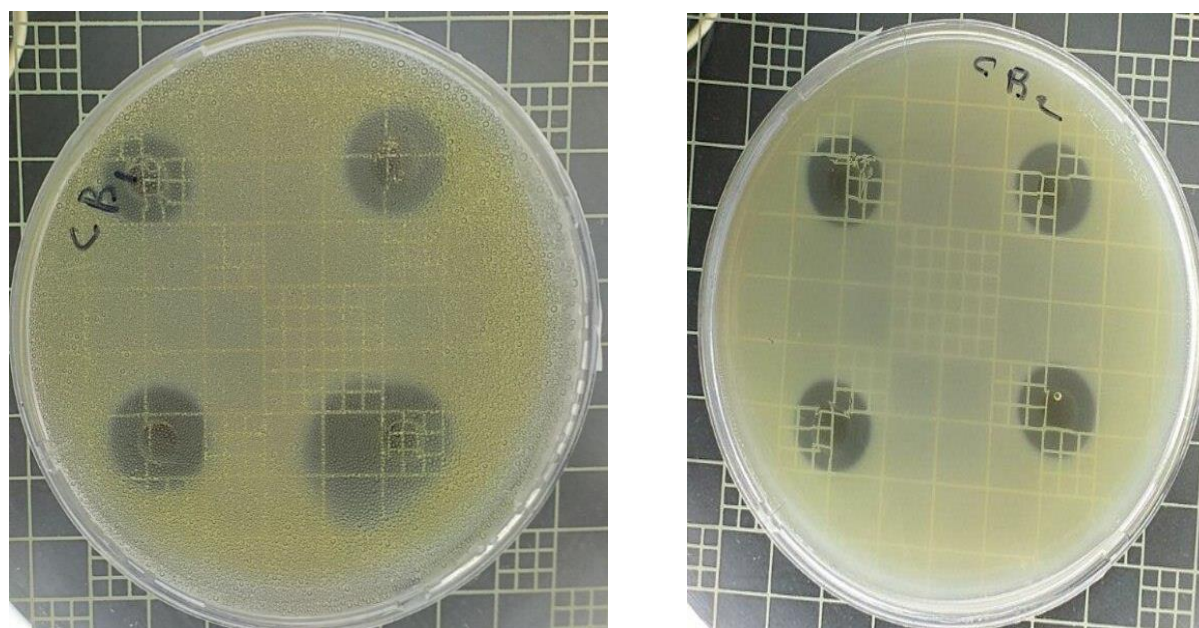


Figure 37 : Activité protéasique des surnageants de milieu, en présence de caséine, pour les isolats B1 et B2, évaluée par la méthode des puits .

4.1.2 .Méthode de disques

Dans ce tableau, l'activité protéolytique est évaluée à l'aide de la méthode des disques imbibés, placés sur une gélose contenant de la caséine. Les diamètres des zones de clarification reflètent le niveau d'hydrolyse réalisé par les enzymes sécrétées par les isolats.

Tableau 25 : représentent les Diamètre des zone par méthode des disques

| Souche | Diamètre de zone |
|--------|------------------|
| B1 | 1.7cm |
| B2 | 1.8cm |

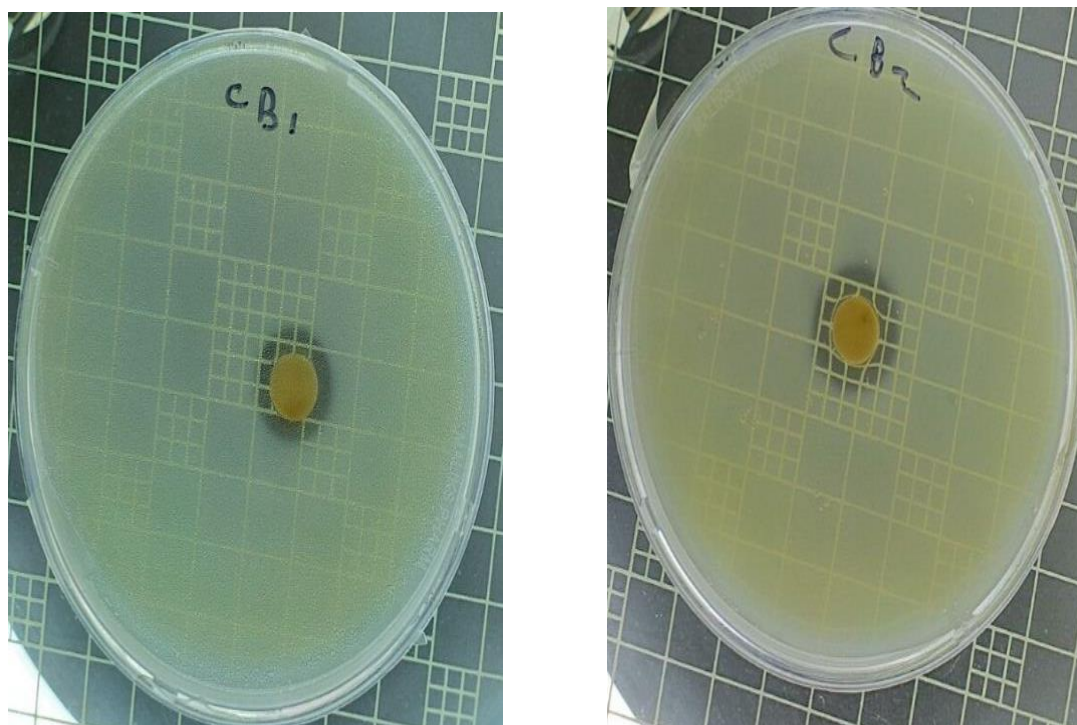


Figure 38 : Activité protéasique des surnageants de milieu, en utilisant la caséine comme substrat, pour les isolats B1 et B2, évaluée par la méthode des disques.

4.2. Production de protéase par lait écrémé

Les différents surnageants obtenus ont été récupérés, puis évalués pour leur activité protéolytique à l'aide des méthodes des puits et des disques.

4.2.1. Méthode de puits

Ce tableau montre les résultats de l'activité enzymatique évaluée par la méthode des puits, en utilisant le lait écrémé comme source de protéines à la place de la caséine.

Tableau 26 : représentent les Diamètre de zone par méthode des puits

| Souche | Diamètre de zone |
|--------|------------------|
| B1 | 1.7 cm |
| B2 | 1.5 cm |

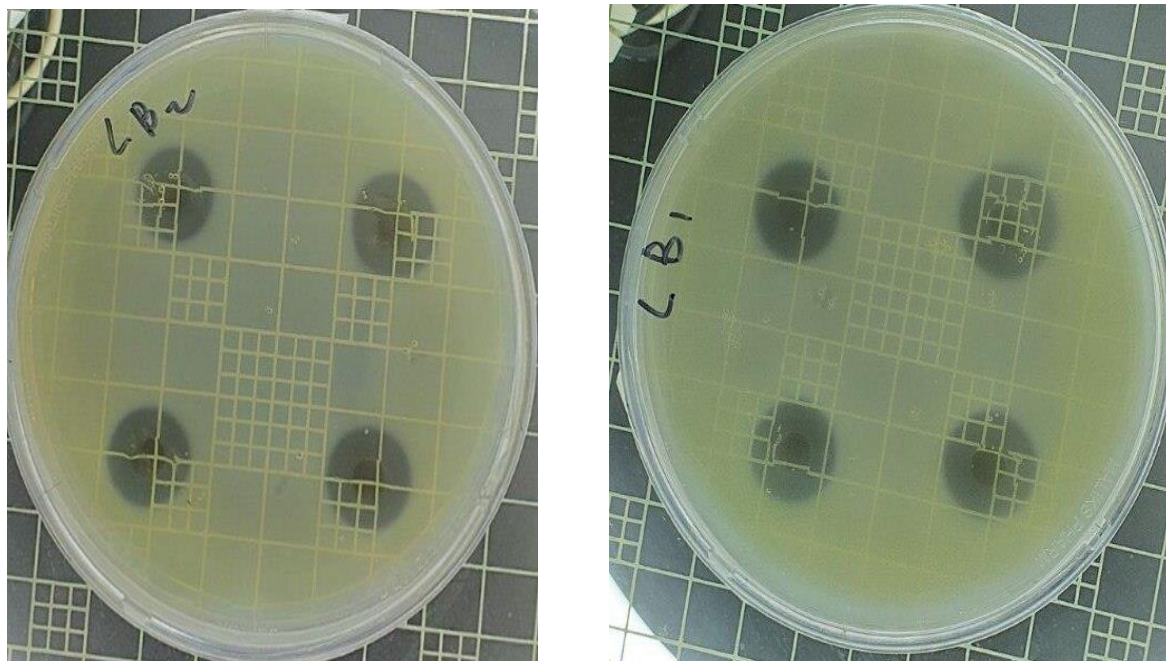


Figure 39 : représentant l'activité protéasique des surnageants de milieu, en utilisant le lait écrémé comme substrat, pour les isolats B1 et B2, évaluée par la méthode des puits.

4.2.2. Méthode de disques

À l'instar du tableau précédent, ce test d'activité protéolytique est réalisé sur une gélose contenant du lait écrémé, mais en appliquant cette fois la méthode des disques imprégnés.

Tableau 27 : représentent les Diamètre de zone par méthode des disques

| Souche | Diamètre de zone |
|--------|------------------|
| B1 | 1.8 cm |
| B2 | 1.6 cm |

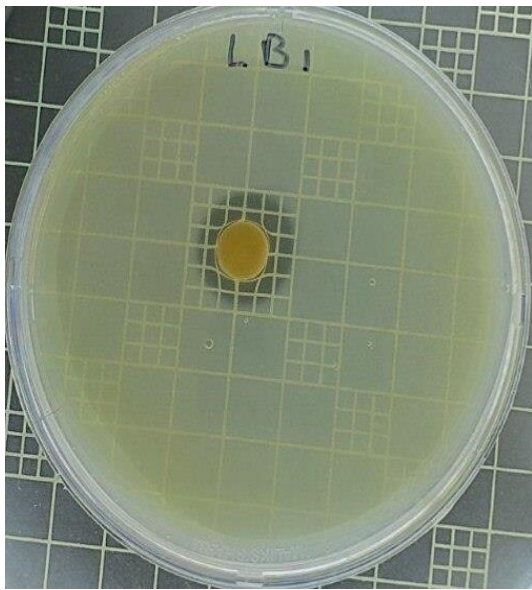


Figure 40 : Activité protéasique des surnageants de milieu, avec le lait écrémé comme substrat, pour les isolats B1 et B2, évaluée à l'aide de la méthode des disques.

5. Test de lavage



Figure 41 : résultat de test de lavage par enzyme protéase (caséine)

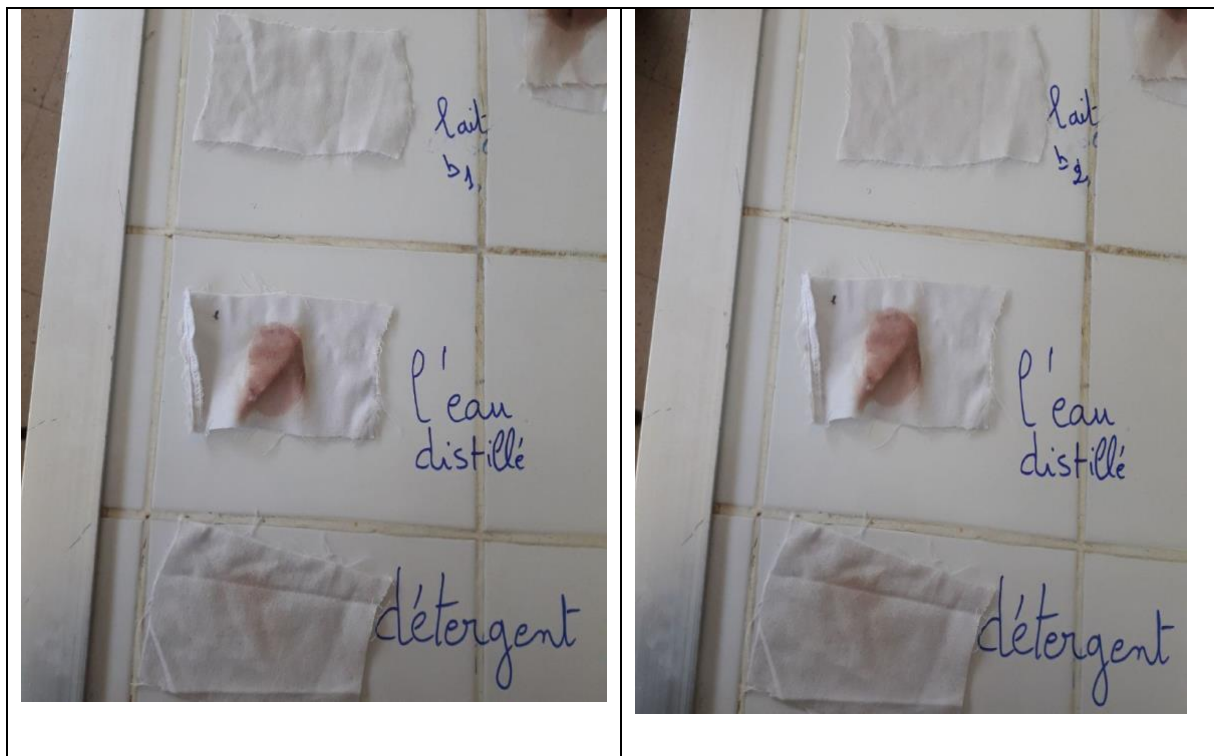


Figure 42 : résultat de test de lavage par enzyme protéase (lait écrémé)

L'activité détergente représente l'un des usages industriels majeurs. À cette fin, les extraits enzymatiques à activité protéolytique issus des souches de *Bacillus* ont été appliqués sur des échantillons de tissu en coton tachés de sang. Les résultats de cette expérience sont illustrés dans les Figures 42 et 43. Lors d'un lavage uniquement à l'eau distillée, les taches de sang persistent sans diminution visible. En revanche, lorsqu'un lavage est effectué avec le détergent seul, une légère atténuation des taches est observée. Toutefois, lorsque les extraits enzymatiques (obtenus en milieu caséine pour les deux souches et en lait écrémé pour les souches B1 et B2) sont combinés à la Solution détergente, les taches de sang disparaissent complètement. Ce résultat démontre une efficacité optimale du nettoyage grâce à l'action synergique entre les enzymes et le détergent.

Discussion

Les propriétés physiologiques et biochimiques de l'isolat ont été analysées et comparées à celles d'autres souches appartenant au genre *Bacillus*. Selon les propriétés suivantes : source de chaleur, production de protéase et caractéristiques biochimiques similaires. Cette comparaison s'est appuyée à la fois sur la classification proposée par (Parvathi et al, 2009) et sur les travaux de (Olajuyigbe et Ajele, 2010) qui a étudié les caractéristiques biochimiques de souches thermophiles de *Bacillus* isolées à partir de la source thermique.

Ce tableau synthétise l'ensemble des caractéristiques biochimiques identifiées chez la souche B1 au cours des différents essais réalisés.

Tableau 28 : Comparaison les caractéristiques biochimique de souche B1

| C.B | Isolat B1 | Auteur | |
|-----------|-----------|------------------------|--------------------------|
| | | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> |
| Gram | + | + | + |
| Endospore | + | + | + |
| Mobilité | - | + | + |
| Catalase | + | + | + |
| Oxydase | - | - | - |
| Amylase | + | + | + |
| Cellulase | - | + | + |
| Lipase | + | / | / |
| Protéase | + | / | + |
| Mannitol | + | - | + |
| Uréase | - | - | - |
| Indole | - | - | - |
| Nitrate | + | + | + |
| VP | - | + | + |
| RM | + | - | - |
| Citrate | - | + | + |
| A/F | A | + | + |

| | | | |
|------------|---|---|---|
| Lécithine | - | / | / |
| Gélatinase | + | + | + |
| T°(4-80C°) | + | / | / |
| Glucose | - | / | / |
| Glucide | - | / | / |
| H2S | - | / | / |
| DHA | - | / | / |

(C.B) : caractéristique biochimique

(/) : caractéristique n'existe pas.

(A) : aérobie

(+): positive

(-):Négative

D'après la comparaison présentée dans le tableau 01, il ressort que l'isolat B1 partage 75 % de similarité biochimique avec *Bacillus subtilis*, selon les données rapportées par **Olajuyigbe et Ajele (2010)**. Dans cette même étude, le pourcentage de similarité avec *Bacillus cereus* n'est que de 70 %. Ces résultats suggèrent que l'isolat B1 appartient au phylum Firmicutes, classe Bacilli, ordre Bacillales, famille Bacillaceae, genre *Bacillus*, et peut être identifié comme une souche apparentée à l'espèce *Bacillus subtilis*.

De façon similaire, ce tableau rassemble les résultats des analyses biochimiques effectuées sur la souche B2, permettant une vue d'ensemble de ses principales caractéristiques.

Tableau 29 : Comparaison les caractéristiques biochimique de souche B2

| C.B | IsolatB2 | Auteur | |
|-----------|----------|------------------------|-------------------------|
| | | <i>B.licheniformis</i> | <i>Bacillus pumilus</i> |
| Gram | + | + | + |
| Endospore | - | + | / |

| | | | |
|------------|---------------------------------|---|---|
| Mobilité | - | + | / |
| Catalase | - | + | + |
| Oxydase | - | - | + |
| Amylase | + | + | + |
| Cellulase | - | / | + |
| Lipase | - | + | + |
| Gélatinase | + | + | + |
| Protéase | + | + | + |
| Mannitol | - | + | / |
| Lécithine | + | / | / |
| Uréase | - | - | - |
| Indole | - | - | - |
| Nitrate | - | + | - |
| VP | - | + | + |
| RM | + | - | / |
| Citrate | - | + | - |
| A/F | A | / | / |
| T°(4-80C°) | + | / | + |
| Glucose | - | / | / |
| Glucide | - - Souf L'arabin ose+ | / | / |

| | | | |
|-----|---|---|---|
| H2S | - | / | / |
| DHA | - | / | / |

(C.B) : caractéristique biochimique

(/) : caractéristique n'existe pas

(A) : aérobie

(+): positive

(-): Négative

Selon les données du tableau 02, l'IsolatB2 présente 55 % de similarité biochimique avec *Bacillus licheniformis*, d'après les résultats rapportés par **Olajuyigbe et Ajele (2010)**. En revanche, une comparaison avec les souches décrites par **Parvathi et al. (2009)** montre un taux de similarité plus élevé, atteignant 75 % avec *Bacillus pumilus*. Ces observations permettent d'identifier la Isolat B2 comme appartenant au phylum Firmicutes, classe Bacilli, ordre Bacillales, famille Bacillaceae, genre *Bacillus*, et plus précisément à l'espèce *Bacillus pumilus*.

Selon **(Nijris, 2022)** les antibiotiques évalués incluaient : Ticarcilline (Tic 75 µg) ; Ticarcilline + acide clavulanique (TTc 85 µg), Acide fusidique (FC 10 µg), Céfoxitine (Cx 30 µg), sont sensible pour les deux isolat B1, B2et pour antibiotique Oxacilline (Ox 1 µg) intermédiaire pour l'isolat B1 et sensible pour l'isolat B2 et pour Néomycine (N 30 µg), Sont intermédiaire pour B1, B2.

Les protéases représentent une classe largement utilisées dans diverses industries, notamment en tant qu'agents d'enzymes de nettoyage. L'analyse des propriétés biochimiques de l'isolat a permis de l'identifier comme appartenant aux espèces *Bacillus subtilis* et *Bacillus pumilus*, toutes deux reconnues comme de bonnes productrices de protéases par fermentation en milieu solide. D'après les travaux de **Feyissa (2025)** et de **Sangeetha et al. (2008)**, *Bacillus pumilus* est capable de synthétiser efficacement ces enzymes. De leur côté, *Bacillus subtilis* a également été confirmé comme producteur de protéases dans les études de **Deviga et al. (2022)** et **Shaheen et al. (2008)**.

Ces enzymes sont fréquemment évaluées pour leur efficacité en tant qu'additifs dans les produits de lavage, notamment pour éliminer les taches organiques. Les travaux menés par **Marathe et al. (2018)** et **Arabaci et Karaytug (2023)** **Baweja et al (2016)**. On montré que la protéase produite par une souche thermophile de *Bacillus permettait* d'éliminer les taches de sang plus efficacement que certains détergents commerciaux.

Conclusion Général

Conclusion Général

Conclusion Général

Dans cette recherche, deux isolats bactériens, désignés B1 et B2, ont été étudiés afin d'évaluer leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et enzymatiques, dans le but d'identifier un candidat du genre *Bacillus* apte à produire une protéase thermostable.

L'isolat B1 se présente comme une souche Gram positif, immobile, sporulée, catalase positive, et dotée d'une forte activité protéasique. Ces traits correspondent à ceux typiquement observés chez les *Bacillus*. La capacité de B1 à former des spores, son métabolisme aérobie ainsi que ses réponses positives aux tests enzymatiques (protéase, gélatine et nitrate) en font un candidat sérieux pour la production de protéase thermostable. Son profil biochimique, caractérisé par une fermentation positive du mannitol, un test RM positif, et des résultats négatifs pour l'uréase et le citrate, appuie davantage cette identification. L'absence d'activités lipasique et amylasique indique une orientation métabolique principalement vers la production d'enzymes protéolytiques.

En revanche, l'isolat B2, bien qu'également Gram positif et de forme bacillaire, se distingue par son incapacité à sporuler, son absence de catalase, son strict aérobisme, ainsi que par la production d'autres enzymes comme l'amylase, la gélatinase et la lécithinase. Même si une activité protéasique est également détectée chez cet isolat, l'absence de spores et de nitrate réductase suggère une moindre aptitude à tolérer des conditions extrêmes, ce qui limite son potentiel pour des applications industrielles requérant des enzymes thermostables.

Ainsi, B1 se démarque comme le candidat le plus prometteur en vue d'une exploitation biotechnologique pour la production de protéase thermostable, grâce à sa sporulation, son profil enzymatique orienté vers la protéolyse et sa robustesse physiologique. Ces atouts en font une base pertinente pour des travaux d'optimisation de la production enzymatique à visée industrielle.

Cette étude a mis en évidence le potentiel biotechnologique des isolats *Bacillus* B1 et B2 dans la production de protéases thermostables par fermentation en milieu solide. Le substrat utilisé, composé principalement de caséine comme source azotée, complété par de la peptone, des sels minéraux, des agents tensioactifs et ajusté à un pH alcalin, a favorisé une forte induction enzymatique. Les deux souches ont exprimé une activité protéolytique significative, démontrant leur capacité à produire des enzymes stables à haute température et en environnement alcalin.

Conclusion Général

Ces observations soulignent l'intérêt de recourir à des souches locales de *Bacillus* dans une perspective de valorisation durable, notamment pour des usages industriels spécifiques tels que les détergents, l'industrie agroalimentaire ou le traitement des déchets organiques. L'exploitation de ce type de bioprocédé pourrait ainsi permettre la production d'enzymes à forte valeur ajoutée, tout en s'inscrivant dans une logique d'innovation écologique .

L'expérimentation portant sur l'emploi de la protéase produite par un isolat de *Bacillus* a mis en évidence son efficacité remarquable dans l'élimination des taches de sang sur textile, notamment à des températures élevées, conditions propices à son activité optimale. Contrairement au témoin négatif (eau seule) et au détergent neutre utilisé comme référence positive, l'enzyme a permis une dégradation rapide et visible des constituants protéiques du sang, tels que l'hémoglobine et d'autres protéines plasmatiques.

Ces résultats attestent que la protéase thermostable obtenue à partir de notre souche de *Bacillus* possède des propriétés enzymatiques solides, la rendant particulièrement adaptée aux usages industriels, en particulier dans la formulation de produits nettoyants enzymatiques comme les lessives et détachants. Sa capacité à maintenir une activité enzymatique efficace à haute température représente un avantage significatif pour les procédés de lavage intensifs utilisant la chaleur comme levier d'efficacité.

Ainsi, la production de cette enzyme par notre isolat peut être envisagée dans une optique de biotechnologie industrielle respectueuse de l'environnement, en substituant les agents chimiques traditionnels par des enzymes biodégradables, performantes et durables. Cette démarche ouvre également la voie à une valorisation économique de la souche microbienne dans le développement de détergents enzymatiques écologiques..

Référence Bibliographique

Références Bibliographique :

-A-

- Aguilar, C. N., & Gutierrez, G. (2008). Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *American journal of biochemistry and biotechnology*, 4(4), 354-366.
- Arabacı, N., & Karaytuğ, T. (2023). Alkaline thermo-and oxidant-stable protease from *Bacillus pumilus* strain TNP93: laundry detergent formulations. *Indian Journal of Microbiology*, 63(4), 575-587.

-B-

- Baweja, M., Tiwari, R., Singh, P. K., Nain, L., & Shukla, P. (2016). An alkaline protease from *Bacillus pumilus* MP 27: functional analysis of its binding model toward its applications as detergent additive. *Frontiers in microbiology*, 7, 1195.
- Beg, Q. K., & Gupta, R. (2003). Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(2), 294-304.
- BENT MOHAMED A., A. MINT SIDA BABA. (2008). « manuel de travaux pratique microbiologie ». Université de nouakchott. P : 18-22.
- Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production - Gopinath - 2017 BioMed Research International - Wiley Online Library
- Bouras, M. (2018). Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de certaines plantes de l'est algérien sur des souches résistantes aux antibiotiques (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar-Annaba).

-C-

- Chellappan, S., Jasmin, C., Basheer, S. M., Elyas, K. K., Bhat, S. G., & Chandrasekaran, M. (2006). Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 41(4), 956-961

-
- Chutmanop, J., Chuichulcherm, S., Chisti, Y., & Srinophakun, P. (2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 83(7), 1012-1018.

-D-

- Dela Cruz, T. E. E., & Torres, J. M. O. (2012). Gelatin hydrolysis test protocol. *AmSocMicrobiol*, 1, 1-10.
- Devi, M. K., Banu, A. R., Gnanaprabhal, G. R., Pradeep, B. V., & Palaniswamy, M. (2008). Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian journal of science and technology*, 1(7), 1-6.
- Deviga, J. T., Ishwarya, R., Geetha, M., & Sangeetha, D. (2022). Studies on The Optimization of Protease Production by Thermophilic *Bacillus subtilis* Isolated from Raw Milk Sample. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci*, 12, 91-98.
- Drouin, M. (2005). Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Institut National de la Recherche Scientifique (Canada).
- Durand, J. (2017). Approches multiples d'ingénierie pour l'utilisation d'enzymes hydrolytiques comme outils de synthèse (Doctoral dissertation, INSA de Toulouse)

-F-

- FAFFANI, G. L. (2015). Les bactéries du (Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar).
- Feyissa, B. H. (2025). Screening, Identification, and Optimization of Protease Producing *Bacillus Pumilus* Strain DT-15 From Tannery Waste Disposal Site in Addis Ababa, Ethiopia. *International Journal of Microbiology*, 2025(1), 7176092.

-G-

- Gao, Q., Wang, Y., Zhang, H., & Wang, Y. (2021). Cell wall structural changes explain Gram variability in *Bacillus* species. *MicrobialCell*, 8(3), 95–104.

-
- Godard, J. (2020). Valorisation de sous-produits végétaux par fermentation pour la production de composés à valeur ajoutée: Production d'acide L-lactique par fermentation de pulpe de carottes (Doctoral dissertation, Université de Lyon).
 - Gomes, J., & Steiner, W. (2004). The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*, 42(4), 223–235.
 - Granner D.K. Murray R.K., Rodwell V.W. (2008). Biochimie de HARPER. 3 édition. De Boeck.Bruxelle . , 47. pp . 49-51, 483.
 - Guiraud, J. P. (1998). Microbiologie Alimentaire. Dunod. Paris. France.
 - Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct Bacillus species clusters based on phylogenomics and comparative genomic analyses. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1681.
 - Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appliedmicrobiology and biotechnology*, 59, 15-32.
 - Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appliedmicrobiology and biotechnology*, 59, 15-32.

-H-

- Haddar, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Sellami-Kamoun, A., & Nasri, M. (2009). Two detergent stable alkaline serine-proteases from Bacillus mojavensis A21: purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *BioresourceTechnology*, 100(13), 3366-3373.
- Hadjidj, R. (2019). <i>Production Purification Et Caractérisation Biochimique Et Moléculaire D'une Nouvelle Protéase Nomée Saphm De La Souche K7a De Bacillus Licheniformis, Isolée De La Région De Hassi Messaoud, Sud Est D'ourgla En Algérie</i> [Thèse de Doctorat, Université Saad Dahleb - Blida]
- Harvey, R. A. (2007). Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins.
- Hussian, C. H. A. C., & Leong, W. Y. (2023). Thermostable enzyme research advances: a bibliometric analysis. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 37.

-J-

-
- Jisha, V. N., Smitha, R. B., Pradeep, S., Sreedevi, S., Unni, K. N., Sajith, S., ...& Benjamin, S. (2013). Versatility of microbial proteases. *Advances in enzyme research*, 1(3), 39-51.

-K-

- Kerouaz , B. (2021) . Optimisation de la production d'une kératinase chez une nouvelle souche d'actinomycète thermophile Cpt20 isolée du compost de poulet : purification , caractérisation biochimique et application dans la valorisation des déchets de plumes (Thèse de doctorat , Université Badji Mokhtar - Annaba) . Université Badji Mokhtar Annaba .
- Konings, W. N., Albers, S. V., Koning, S., & Driessen, A. J. M. (2002). The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 61–72
- Kumar, A. G., Nagesh, N., Prabhakar, T. G., & Sekaran, G. (2008). Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresource Technology*, 99(7), 2364-2372.
- Kumar, C. G., & Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology advances*, 17(7), 561-594.
- Kumar, C. G., Malik, R. K., & Tiwari, M. P. (1998). Novel enzyme-based detergents: an Indian perspective. *Current Science*, 75(12), 1312-1318 ;

-L-

- Leisola, M., Jokela, J., Pastinen, O., Turunen, O., & Schoemaker, H. (2001). Industrial use of enzymes. Eolss Publication.
- Leisola, M., Jokela, J., Pastinen, O., Turunen, O., & Schoemaker, H. (2001). Industrial use of enzymes. Eolss Publication
- Logan, N. A., & De Vos, P. (2009). *Bacillus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp. 21–128). Springer.

-M-

- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021). *Brock Biology of Microorganisms* (16th ed.). Pearson.

-
- Manel, D. (2015). Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques: étude bactériologique et moléculaire (Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar).
 - Marathe, S. K., Vashistht, M. A., Prashanth, A., Parveen, N., Chakraborty, S., & Nair, S. S. (2018). Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenesfaecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from sea water samples. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1), 39-46
 - Mathieu, D. (2005). Etude de la production des protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Métrise. INRS-Eau Université du Québec, Canada.

-N-

- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 548–572.
- Nijris, O. (2022). أساسيات المنهج العملي للأحياء المجهرية [Principes fondamentaux de la méthodologie pratique en microbiologie]. Scribd.
- Nisha, N. S., & Divakaran, J. (2014). Optimization of alkaline protease production from *Bacillus subtilis* NS isolated from sea water. *African Journal of Biotechnology*, 13(16).

-O-

- Olajuyigbe, F. M., & Ajele, J. O. (2011). Thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* LBBL-11 isolated from traditionally fermented African locust bean (*Parkia biglobosa*). *Journal of Food Biochemistry*, 35(1), 1-10.
- OUALI, S. Les sources Thermales en Algérie» bulletin des énergies renouvelables N 13 Juin 2008.

-P-

- Parvathi, A., Krishna, K., Jose, J., Joseph, N., & Nair, S. (2009). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 269-275.

-
- Patel, R., Dodia, M., & Singh, S. P. (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. *Process Biochemistry*, 40(11), 3569-3575.
 - Pelmont, J. (1995). *Enzymes: catalyseurs du monde vivant*. (No Title).
 - Prevot, V. (2013). *Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide* (Doctoral dissertation, Université de Reims Champagne-Ardenne).

-R-

- Ramnath, L., Sithole, B., & Govinden, R. (2017). Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in the pulping industry. *Biotechnology Reports*, 15, 114-124
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597-635.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597-635.
- Razvi, A., & Scholtz, J. M. (2006). Lessons in stability from thermophilic proteins. *Protein Science*, 15(7), 1569–1578.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 110.
- Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010). The heat shock response: Life on the verge of death. *Molecular Cell*, 40(2), 253–266.

-S-

- 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.

-
- Sangeetha, R., Geetha, A., & Arulpandi, I. (2008). Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent. *Internet J Microbiol*, 5(2), 1-8.
 - Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1–17.
 - Setlow, P. (2014). Germination of spores of *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium*: What's the difference? *Journal of Bacteriology*, 196(7), 1297–1305.
 - Shaheen, M., Shah, A. A., Hameed, A., & Hasan, F. (2008). Influence of culture conditions on production and activity of protease from *Bacillus subtilis* BS1. *Pak. J. Bot*, 40(5), 2161-2169
 - Sharma, M., Gat, Y., Arya, S., Kumar, V., Panghal, A., & Kumar, A. (2019). A review on microbial alkaline protease: an essential tool for various industrial approaches. *Industrial Biotechnology*, 15(2), 69-78.
 - Siliakus, M. F., van der Oost, J., & Kengen, S. W. M. (2017). Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure. *Extremophiles*, 21, 651–670
 - Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2022). Microbial enzymes: Industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 12, 147. *microbienne* (Turner et al., 2007 ; Bhalla et al., 2013).
 - Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., & Mehta, P. K. (2016). Microbial proteases in commercial applications. *J Pharm Chem Biol Sci*, 4(3), 365-374.
 - Sterner, R., & Liebl, W. (2001). Thermophilic adaptation of proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 36(1), 39–106

-T-

- TIFRIT, A. (2016). Isolement et caractérisation des bactéries à intérêts biotechnologiques à partir de niches écologiques Algériennes (Doctoral dissertation, ABBOUNI Bouziane).
- Try, S. (2018). Production d'arômes par fermentation en milieu solide (Doctoral dissertation, Université Bourgogne Franche-Comté).

-V-

-
- Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 1–43.

-W-

- Wang, Q., Xia, Y., Liu, J., & Zeng, Y. (2015). Molecular characterization of DNA-binding proteins involved in genome stabilization in thermophiles. *Journal of Molecular Biology*, 427(18), 3041–3054.

❖ **Site web**

https://www.creative-enzymes.com/similar/acid-protease_24.html

- <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2017/1272193>

- <http://www.medicinehack.com/2012/02/gram-staining-procedure-mechanism.htm>

- <https://www.scribd.com/document/812349116/اساسيات-المنهج-العملي-للاحياء-المجهرية>

Annexes

Annexes 01 :

Matériel

Boite pétrie

Bécher

Bec bunsen

Pipette pasteur

Micro pipette (10 ml,1 ml).

Becher de 50 ml,25 ml

Papier aluminium

Spatule

Lames et Lamelles

Anse de platine

Pince

Erlenmeyer

Les appareils utilisés :

Microscope optique

Etuve

Agitateur a barreau magnétique

Plaque chauffante.

Autoclave

Balance électrique

Vortex

Bain marie

Réfrigérateur

Centrifugeuse

Ph mètre

Produits chimiques

Eau distillé - Lugol - violet de gentiane - Huile d'immersion - Fuchsine - Alcool - Eau

Physiologie -Vert de malachite

Annexes 02 :

Milieux de culture

Gélose nutritive

| | |
|--------------------------|-----|
| Extrait de levure..... | 2g |
| Extrait de viande..... | 1g |
| Peptone..... | 5g |
| Chlorure de sodium | 5g |
| Agar..... | 15g |

pH = 7,4

Milieu citrate de Simmons :

Composition :

| | |
|--------------------------------------|------|
| Chlorure de sodium..... | 5g |
| Sulfate de magnésium..... | 0,2g |
| Phosphate d'ammonium POH..... | 1g |
| Phosphate di potassique POHK..... | 2g |
| Citrate trisodique | 2g |
| Solution de bleu bromothymol 1%..... | 8ml |

| | |
|--------------------|-------|
| Agar..... | 15g |
| Eau distillée..... | 1000g |

Gélose Mueller-Hinton

Composition :

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Hydrolysate acide de caséine..... | 17,5g |
| Infusion de viande..... | 2,0g |
| Amidon soluble..... | 1,5g |
| Agar | 17,0g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |

Milieu mannitol-mobilité :

Composition :

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Peptone pancréatique de viande..... | 20g/L |
| Agar – agar..... | 4g/L |
| Mannitol..... | 2g/L |
| Nitrate e potassium..... | 1g/L |
| Rouge de phénol solution à 1%..... | 4ml |
| Eau distillée..... | 1000ml |

Milieu Clark et Lubs :

Composition :

| | |
|----------------------------------|--------|
| Peptone tryptique de caséin..... | 5g/L |
| Phosphate bi potassique..... | 5g/L |
| Glucose..... | 5g/L |
| Eau distillée..... | 1000ml |

Milieu urée indole :

Composition :

| | |
|------------------------------------|--------|
| L-tryptophane..... | 3g |
| Phosphate monopotassique..... | 1g |
| Phosphate di potassique..... | 1g |
| Chlorure e sodium..... | 5g |
| Urée..... | 20g |
| Solution rouge de phénol à 1%..... | 2,5ml |
| Alcool à 95°..... | 10ml |
| Eau distillée..... | 1000ml |

Milieu jaune d'oeuf

| | |
|------------------------|--------|
| Gélose nutritive....., | 28 g |
| L'eau distillée,....., | 1000ml |
| Jaune d'oeuf..... | 100 ml |

Les milieu liquide

Bouillon nutritif

| | |
|--------------------------|--------|
| Peptone | 10,0g |
| Extrait de levure | 5,0g |
| Chlorure de sodium | 5,0g |
| Eau distillée | 1000ml |

pH = 7,2

Gélose à la gélatine

| | |
|---------------|------|
| Peptone | 05 g |
|---------------|------|

| | |
|----------------------|---------|
| Extrait de bœuf..... | 03 g |
| Gélatine | 04 g |
| Agar | 15g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |

pH=7

Milieu de fermentation de protéase(caséine)

| | |
|---------------------------------------|------|
| caséine | 5 g |
| citratetrisodique | 10g |
| peptone | 10g |
| MgSO ₄ | 0,5g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,3g |
| KCl | 0,3g |

Deux gouttes de Tween 80,

pH entre 7 et 9,1.

Milieu de fermentation de protéase (lait écrémé)

| | |
|---------------------------------------|-------|
| lait écrémé stérile | 5ml |
| citratetrisodique | 10g |
| peptone | 10 g |
| MgSO ₄ | 0,5 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,3 g |
| KCl | 0,3g |

Deux gouttes de Tween 80 ,

pH entre 7 et 9,1.

Annexe 03 : Milieux pour les tests enzymatiques

Gélose à tween 80

| | |
|-------------------------|------|
| Peptone..... | 10g |
| CaCl ₂ | 0.1g |
| Tween 80..... | 10ml |
| Agar..... | 15g |

La gélose de cellulose

| | |
|----------------------|-------|
| Cellulose | 1g |
| Agar..... | 1.5g |
| L'eau thermale | 100ml |

La gélose del'amidon

| | |
|---------------------|-------|
| Amidon | 1g |
| Agar | 1.5g |
| L'eau thermale..... | 100ml |

Gélose au lait écrémé

| | |
|-------------------------|-------|
| Agar | 15g |
| Peptone....., | 5g |
| Chlorure de sodium..... | 5g |
| Extrait de viande | 1.5g |
| Extrait de levure..... | 1.5g |
| Lait écrémé..... | 100ml |

Gélose de lipase

| | |
|------------|-----|
| Agar | 15g |
|------------|-----|

| | |
|-------------------------|------|
| Peptone..... | 5g |
| Chlorure de sodium..... | 5g |
| Extrait de viande | 1.5g |
| Extrait de levure..... | 1.5g |
| Tween80..... | 10ml |

Composition de l'eau thermale

Carbon (CO₂)

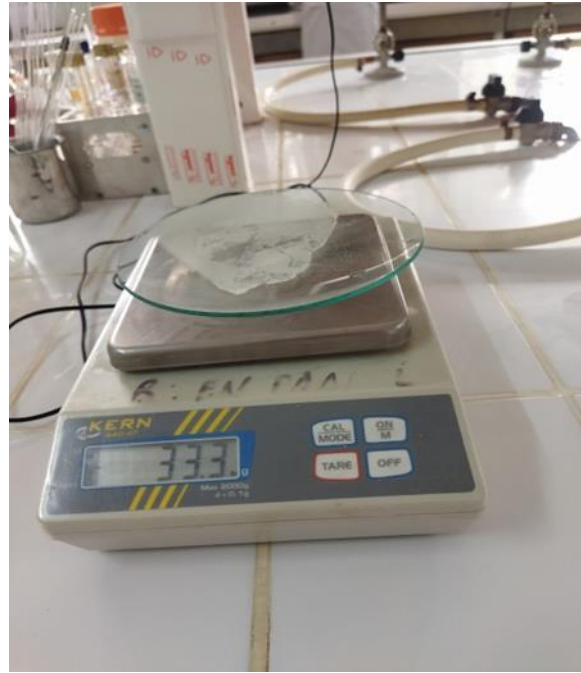
Clôturée sodique

Température 57°C à 72°C

Ph= 6,88

Annexes III

L'échantillonnage

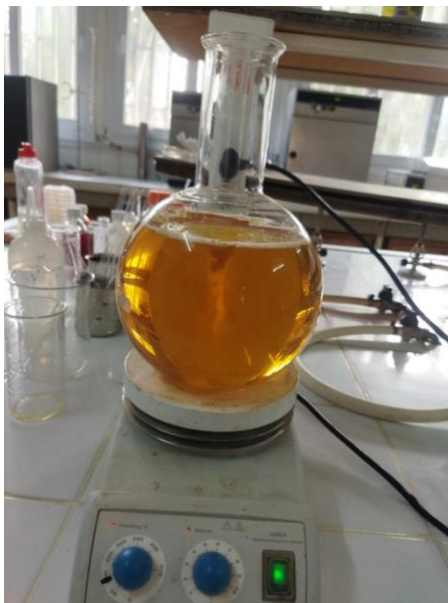


1. Préparation des milieux des cultures :

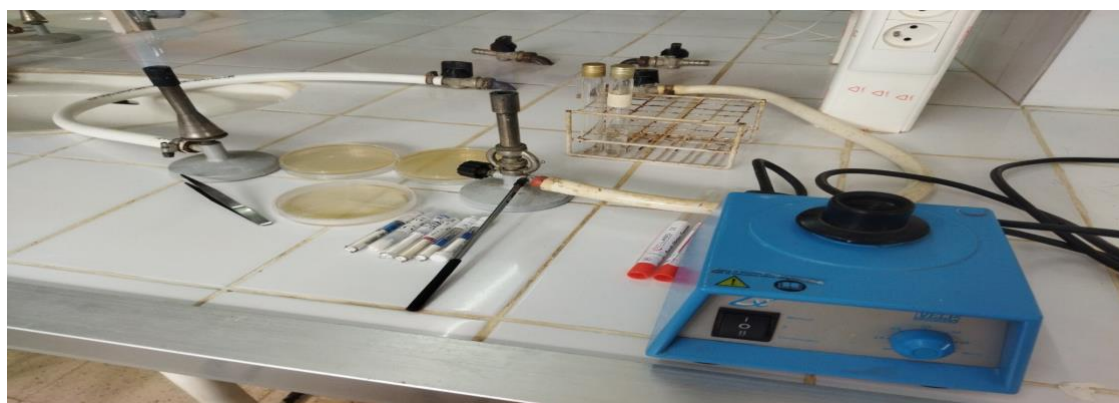
1.2 Préparation de milieu GN



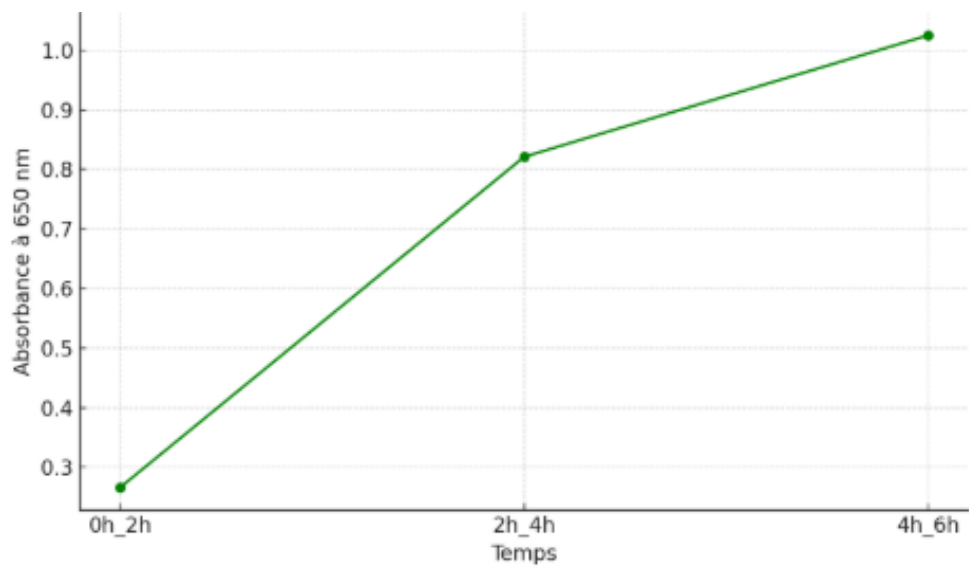
1.3 Préparation de bouillon nutritive



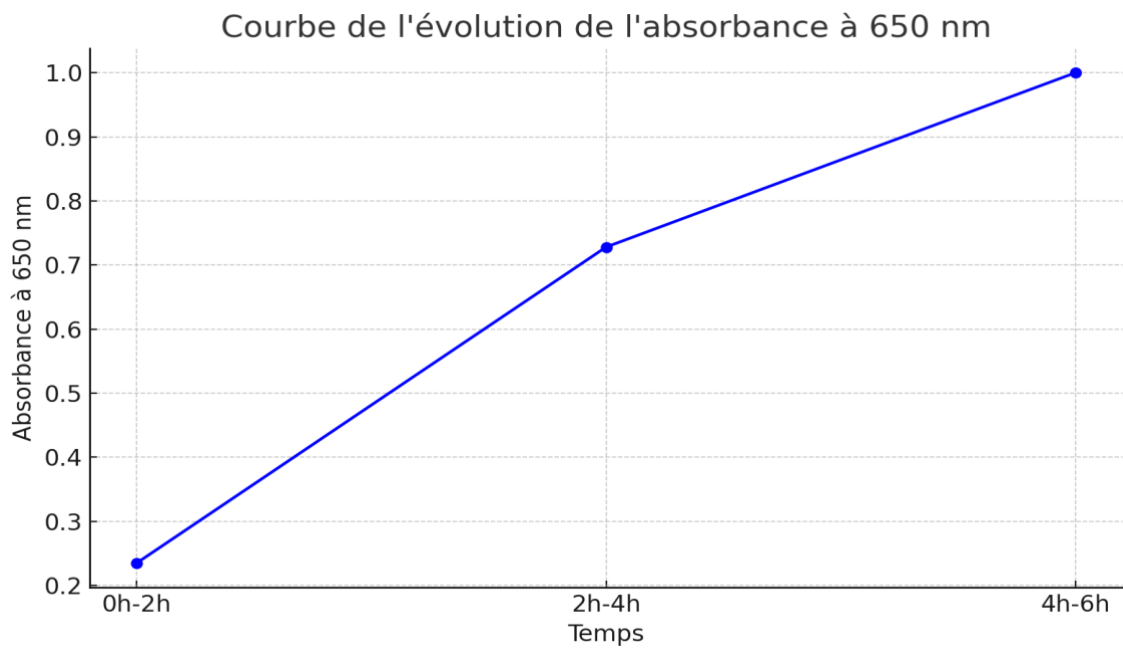
2. Test de sensibilité aux antibiotiques :



3. Identification biochimique par la Galerie api 20^E






























Courbe d'étalonnage de croissance du bactérie B1



Courbe d'étalonnage de croissance du bactérie B2

4. Tableau de lecture de la galerie api 20 E

| Microtube | Substrat | Caractère recherché | Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire) | Résultat + | Résultat - |
|-----------------------------------|---|---------------------------------|--|--|---|
| ONPG | Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside | β -galactosidase | Lecture directe |  |  |
| ADH | Arginine | Arginine dihydrolase | Lecture directe |  |  |
| LDC | Lysine | Lysine décarboxylase | Lecture directe |  |  |
| ODH | Ornithine | Ornithine décarboxylase | Lecture directe |  |  |
| CIT | Citrate | Utilisation du citrate | Lecture directe |  |  |
| H ₂ S | Thiosulfate de sodium | Production d'H ₂ S | Lecture directe |  |  |
| URE | Urée | Uréase | Lecture directe |  |  |
| TDA | Tryptophane | Tryptophane désaminase | Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer |  |  |
| IND | Tryptophane | Production d'indole | Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs |  |  |
| VP | Pyruvate de sodium | Production d'acétone | Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol |  |  |
| GEL | Gélatine emprisonnant des particules de charbon | Gélatinase | Lecture directe |  |  |
| GLU à ARA | Substrat carboné | Utilisation de substrat carboné | Lecture directe |    |  |
| NO ₂ / NO ₃ | Nitrates (NO ₃) | Nitrate réductase | Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif |  | |