



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

THÈME

Isolement et purification d'une souche
thermophile de *Bacillus* sp productrice
des amylases, et l'évaluation de leur
paramètre cinétique enzymatique

Présenté par

M^{elle} Ben Baghdad samah

M^{elle} Boussada souaad

Soutenu publiquement le 10/07/2019

DEVANT LE JURY

Président : Mr R. Djibaoui

Grade Pr

Université de Mostaganem

Encadreur: MelleF. Tissouras

Grade MCA

Université de Mostaganem

Examinatrice : Mme W. Sidhoum

Grade MCB

Université de Mostaganem

Année universitaire 2018-2019

Remerciement

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de M^{elle} tissouras Fatiha, on vous remercie pour la qualité de votre encadrement exceptionnel, pour ta patience, ta rigueur et ta disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Notre remerciement s'adresse à tous les responsables du laboratoire microbiologie 02 pour leurs soutiens moral et ses encouragements.

Nous sommes conscientes de l'honneur que nous a fait Mr R. Djibaoui professeur à l'université de Mostaganem en étant président du jury et Mme W. Sidhoum maitre de conférences à l'université de Mostaganem d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Notre remerciement s'adresse également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont, ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Nos profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenues de près ou de loin.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :....

Mes parents : Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude. Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie.

Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit. Mes frères et sœurs : hayat et ahlam qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

A ma chère amie ahlam et mon binôme Souad Boussaâda

Et je n'oublier pas la personne qui m'aide beaucoup pour réaliser ce modeste travaille

Tous mes professeurs qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis.

A tous les étudiants de 2 ème année master microbiologie appliquée

Samah

Dedicace

Je remercie dieu de m'avoir accordé des connaissances de la science et de m'avoir aidé à réaliser ce travail. Avant tous, je dédie à :

- *Mon cher père (Rahimah Allah) qui m'a donné la force et le courage pour réaliser ce travail.*
- *Ma très chère mère que dieu la garde et la protège qui m'a encouragé et qui m'a donné l'assistance.*
- *Toute ma famille, ma sœur Fatiha et mes frère Ismail et Laid.*
- *Son oublier tous mes amis surtout : Nadia, Hanane, Mokhtaria, Wahiba, Imene, Djamila ; et ma binôme Samah*
.
- ❖ *Tous mes professeurs qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis.*
- ❖ *A tous les étudiants de 2ème année Master Microbiologie Appliquée*

souad

Liste des abréviations

MO : Matière organique

MOS : Matière organique du sol

EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique

GN : Gélose nutritive

B : *Bacillus*

VP : Réactif de voges-proskauer

RM : Réactif Rouge de Méthyle

NR1et 2 : Réactif de Greiss de test nitrate réductase

TSI : Triple sugar Iron

UV : Ultraviolet visible

Vi : Vitesse initiale d'oxydation

V max : Vitesse maximale d'oxydation

Km : Constante de Michaelis menten.

DO : Densité optique

Liste des figures

N	Titre	P
1	Les différents horizons d'un profil de sol	4
2	Structure tridimensionnelle de l' α amylase	14
3	Protocole expérimental général	16
4	Présentation du site des prélèvements	17
5	Stratégie du prélèvement des échantillons de sol	18
6	Techniques de dilutions de sol	18
7	Aspect macroscopique des colonies des <i>Bacillus</i> sp.	27
8	Aspect microscopique des cellules des <i>Bacillus</i> sp coloration de Gram (G100x).	28
9	Résultats des tests biochimiques de la souche <i>Bacillus</i> sp.	29
10	Résultats de l'activité enzymatique	30
11	Résultat de type respiratoire	31
12	Courbe de la gamme d'étalonnage de la protéine ovalalbumine	32
13	Courbe de la gamme d'étalonnage du sucre réducteur pure le glucose.	33
14	Cinétique enzymatique des extraits d'amylases vis-à-vis son substrat (amidon) en fonction du temps.	33
15	Les vitesses de la cinétiques des extraits d'amylases vis-à-vis son substrat (amidon) en fonction du produit libéré.	34

Liste des tableaux

N	Titre	P
1	Abondance et biomasse des organismes vivants du sol	6
2	Différentes nomenclatures d' α -amylase	12
3	Différentes α -amylases microbiennes et leur action	13
4	Aspect morphologique des colonies obtenues sur GN après 24h d'incubation.	27
5	les résultats des tests biochimiques	28
6	Activités enzymatiques des souches isolées.	30
7	Les paramètres cinétiques de l'extrait enzymatique de <i>Bacillus</i> sp.	34

Table des matières

Introduction.....	01
Partie 1 : Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Généralités sur le sol	
1. Définition.....	02
2. Diverses phases du sol	02
2.1. La phase solide du sol	02
2.2. La phase liquide du sol	02
2.3. La phase gazeuse du sol.....	02
3. Les fractions constitutives du sol.....	03
3.1. Les fractions minérales.....	03
3.2. Les fractions organiques.....	03
4. Les fonctions multiples du sol.....	03
5. Les horizons du sol.....	04
6. Propriétés physiques du sol.....	04
✓ Structure.....	04
✓ Texture.....	05
✓ Porosité.....	05
✓ Connectivité.....	05
Chapitre II : Généralités sur la microflore	
1. Définition de la microflore du sol.....	06
2. Présentation des microorganismes.....	06
2.1. Les algues.....	06
2.2. Les protozoaires.....	06
2.3. Les champignons.....	07
2.4. Les bactéries.....	07
2.4.1. Procaryotes photosynthétiques.....	07
2.4.2. Les bactéries non photosynthétiques.....	07
3. Les communautés microbiennes et leur activité.....	08
3.1. Influence de la température.....	08
3.2. Influence de la dynamique de l'eau et des gaz.....	08
3.3. Influence de la quantité et de la qualité de la matière organique.....	09
3.4. Influence de la texture du sol.....	09
3.5. Influence du pH.....	09
4. Caractérisation du genre <i>Bacillus</i> sp.....	10
4.1. Définition du genre <i>Bacillus</i> sp.....	10
4.2. Taxonomie.....	10
4.3. Aspects morphologiques.....	10
4.4. Culture.....	10
4.5. Les intérêts de <i>Bacillus</i> sp.....	11
Chapitre III : Les enzymes	
1. Définition des α -amylases.....	12
2. Nomenclature.....	12
3. Différentes origines.....	12
3.1. Origine végétale.....	12
3.2. Origine microbienne.....	13

3.3. Origine animale.....	13
4. Structure et mécanisme d'action.....	13
5. Caractéristiques spécifiques des amylases.....	14
5.1. Spécificité de substrat.....	14
5.2. Température optimale.....	15
5.3. PH optimal.....	15
5.4. Ions métalliques.....	15

Partie 2 : Etude expérimentale

Chapitre IV: Matériel et Méthodes

1. Objective.....	16
2. Protocole expérimental.....	16
3. Description du site de prélèvement.....	17
4. Prélèvement des échantillons.....	17
5. Méthodes d'étude.....	18
5.1. Préparation des suspensions de sol.....	18
5.2. Test de thermorésistants des dilutions et l'isolement des bacilles.....	19
5.3. Purification.....	19
6. Identification des souches.....	19
6.1. Etude macroscopique.....	19
6.2. Etude microscopique.....	19
7. Tests biochimiques.....	20
7.1. Test de la catalase.....	20
7.2. La production d'H ₂ S.....	20
7.3. Utilisation du citrate.....	21
7.4. Recherche de l'uréase.....	21
7.5. Recherche du nitrate-réductase.....	21
7.6. Recherche de métabolites formés à partir de l'acide pyruvique.....	22
7.7. Test de l'hydrolyse de l'amidon.....	22
7.8. Test d'hydrolyse de la caséine.....	23
7.9. Hydrolyse de la lécithine.....	23
7.10. protéolyse de la gélatine.....	23
8. Le type respiratoire.....	23
9. Production d'amylase par fermentation submergé.....	24
9.1. Préparation de l'inoculum.....	24
9.2. Inoculation des milieux de fermentation.....	24
9.3. La fermentation submergée et l'extraction de l'enzyme.....	24
10. La cinétique des extraits enzymatiques.....	24
10.1. Dosage colorimétrique des extraits enzymatiques par la méthode de Biuret.....	24
10.2. Préparation de la gamme d'étalonnage du glucose.....	25
10.3. La cinétique des extraits enzymatiques.....	25

Chapitre V : Résultats et Discussion

1. Aspects morphologiques des <i>Bacillus</i> sp.....	27
1.1. Aspects macroscopiques.....	27
1.2. Aspects microscopiques.....	27
2. Résultats des tests biochimiques.....	28
3. Résultats des activités enzymatiques.....	30
4. Résultat de type respiratoire.....	31
5. Production des extraits enzymatique de <i>Bacillus</i> sp.....	31

5.1. Dosage des extraits enzymatiques par la réaction de Biuret.....	31
5.2. Cinétique des extraits d'amylasiques des isolats <i>Bacillus</i> sp.....	32
5.3. Mesure des paramètres cinétiques.....	33
Conclusion et perspective.....	35
Références bibliographiques.....	36
Annexe.....	43
Résumé.....	

Introduction

Introduction

Les amylases sont des enzymes de la classe des hydrolases, elles sont considérées parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle. En effet, le marché mondial des enzymes est représenté par 80% des hydrolases, particulièrement les amylases et les protéases (Morvan, 2010). En Algérie, les α -amylases sont utilisées dans diverses industries agroalimentaires, pharmaceutiques et agronomiques, ce qui nécessite leurs études pour une production intense. Les amylases constituent une classe d'enzymes industrielles ayant approximativement 25-30% du marché des enzymes (Rajagopalan et Krishnan, 2008). Le processus de fermentations et des enzymes microbiennes présentent de nombreux avantages par rapport à celle d'origine animale et végétale.

Les enzymes microbiennes sont largement utilisées dans les procédés industriels en raison de leur faible coût, grande productivité, protection de l'environnement, leurs plasticités et disponibilités (Burhan *et al.*, 2003). Les espèces de *Bacillus* sont très utilisées dans les industries pour la production de diverses enzymes, ainsi que, d'autres substances bioactives.

La production d' α -amylase par des procédés biotechnologiques (fermentations), nécessite en premier temps, l'identification et la sélection des microorganismes amylolytiques. Le choix d'un substrat de fermentation convenable en éléments nutritifs nécessaires au développement des microorganismes et la production d' α -amylase.

Dans ce travail des objectifs ont été tracés selon la méthodologie suivante :

- ❖ Synthèse bibliographiques sur le sol, la microflore et la caractérisation de genre *Bacillus* sp, et enfin une présentation des enzymes.
- ❖ Etude expérimentale qu'est structuré en deux chapitres matériel et méthodes présentant plusieurs étapes du travail telles que : L'isolement du genre *Bacillus* sp sur un milieu sélectif ; La purification et l'identification macroscopique et microscopique d'isolat ; Pré-identification par des tests biochimiques et physiologiques ; L'utilisation de souche de *Bacillus* sp dans la production d'amylase par fermentation submergée et l'évaluation des paramètres cinétique de l'extrait brut d'enzyme d'amylase. Le dernier chapitre englobe les différents résultats avec une interprétation, suivi d'une conclusion générale et de quelques perspectives.

Partie I
Synthèse bibliographique

Chapitre I

Généralités sur le sol

I. Généralités sur le sol**1. Définition**

Les sols forment l'élément essentiel des biotopes continentaux, ces derniers sont dénommés la pédosphère. Elle résulte de l'interaction de deux compartiments biosphériques, l'atmosphère et les deux couches superficielles de la lithosphère. Cinq principaux facteurs impliqués dans la formation du sol sont la roche mère, le climat, la topographie, l'activité biologique et le temps (**Atlas et Bartha, 1992**). Le sol a de nombreuses fonctions, c'est un milieu biologique dans et sur lequel se développent des organismes vivants. Ce développement dépend de la qualité de ce sol ou fertilité (quantité de carbone, d'azote, capacité d'échange ionique, etc.). Il est aussi un acteur déterminant du cycle de l'eau (stockage et régulation) et de la qualité de cette eau (source de pollution, capacité de rétention des polluants et leurs biodégradations). Toutefois, le sol joue un rôle important dans tous les cycles biogéochimiques (**Quénéa, 2004**).

2. Diverses phases du sol

Les sols sont des milieux poreux, composés de les trois phases, solide, liquide, gazeuse.

2.1. La phase solide du sol

Elle est constituée par des minéraux et des matières organiques en proportions variables. La fraction minérale solide représente environ 93 à 95 % du poids total du sol. Elle est composée d'éléments de tailles très diverses, provenant de la fragmentation de la roche mère. En plus, dans cette phase la matière organique végétale inerte provient de l'activité de tous les organismes présents à la surface ou à l'intérieur du sol. Elle constitue aussi un élément majeur après la fraction minérale. Le reste de la MO est constitué par les débris des végétaux et d'animaux morts, ainsi que, les cellules microbiennes lysées (**Davet, 1996**).

2.2. La phase liquide du sol

La phase liquide du sol n'est pas de l'eau pure, c'est une solution dont la composition est complexe et très variable. Elle contient de très nombreuses substances organiques et inorganiques, ionisées et non, dissoutes dans la solution du sol électrolytes. Elle contient également des ions H^+ et OH^- dont les concentrations déterminent la réaction du sol caractérisée par son pH (**Davet, 1996**).

2.3. La phase gazeuse du sol

Cette phase occupe les pores du sol, elle a une composition voisine de celle de l'air, avec une légère variation dans l'espace et dans le temps. Elle dépend principalement de deux facteurs, de l'activité biologique et la profondeur dans le sol (**Calvet, 2003**).

3. Les fractions constitutives du sol

3.1. Les fractions minérales

Il existe trois catégories majoritaires dans le sol :

- **Les silicates** : Ce sont des oxydes de silice qui sont souvent associés à des cations métalliques tels que l'aluminium, le fer ou le magnésium. Leurs structures sont très diverses comme : (olivine $(\text{Fe}, \text{Mg})_2 [\text{SiO}_4]$); Chaîne (pyroxène $(\text{Mg}, \text{Fe})_2(\text{SiO}_3)_2$).
- **Les oxydes, oxy-hydroxydes et hydroxydes** : Les plus importants et les très abondants dans les sols sont : La gibbsite (oxyde d'aluminium $\text{Al}(\text{OH})_3$), La goëthite et l'hématite (oxydes de fer (Fe O-OH), (Fe_2O_3)).
- **Les carbonates** : Les plus abondants sont les carbonates de calcium (calcite) et les carbonates de magnésium (Dolomite $(\text{Ca}, \text{Mg}) (\text{CO}_3)_2$). Ceux-ci peuvent Co-précipiter avec d'autres métaux (ex : calcite magnésienne), ou forme un revêtement sur d'autres minéraux en changeant ainsi leurs propriétés de surfaces (**Sposito, 2008**).

3.2. Les fractions organiques

En ce qui concerne la matière organique du sol, elle correspond à tout ce qui est constitué de carbone organique ou inorganique (insectes, plantes, humus, microorganismes etc.). L'humus est regroupé l'ensemble de la matière organique non vivante du sol et qui peut être classé en deux catégories :

- La matière organique libre, séparable par des moyens physiques, correspondant essentiellement aux débris végétaux (résidus culturaux divers, racines mortes),
- La matière organique liée à la fraction minérale, non séparable par des moyens mécaniques, c'est-à-dire associée aux minéraux du sol, appelée traditionnellement humus, de couleur noirâtre. (**Pansu et Gautheyrou, 2001**).

4. Les fonctions multiples du sol

D'après **Gobât et al. (2003)**, le sol joue un rôle irremplaçable à la surface du globe par ses fonctions naturelles, telles que :

- Support pour les êtres vivants ;
- Réservoir de matières organiques et minérales ;
- Régulateur des échanges et des flux dans l'écosystème ;
- Lieu de transformation de la matière organique ;
- Système épurateur de substances toxiques.

5. Les horizons du sol

Après avoir subi au cours du temps divers processus d'altération, d'humidification et de différenciation, le sol se présente sous la forme d'une succession de couches superposées, plus ou moins distinctes selon son état d'évolution (fig. 1). Ces couches diffèrent l'une de l'autre par un ou plusieurs caractères tels que la texture, la structure et la présence ou l'absence en certaines substances etc. Chaque couche, correspond à un horizon, elle a des propriétés particulières, plus ou moins proches de celles des couches sus et sous-jacentes. L'ensemble des horizons forme le profil du sol. Ce dernier peut aussi être défini comme l'épaisseur totale du sol. Il a un certain nombre de propriétés importantes du point de vue écologique, qui le rendent différent de la roche-mère (fig. 1) (Anonyme, 2012).

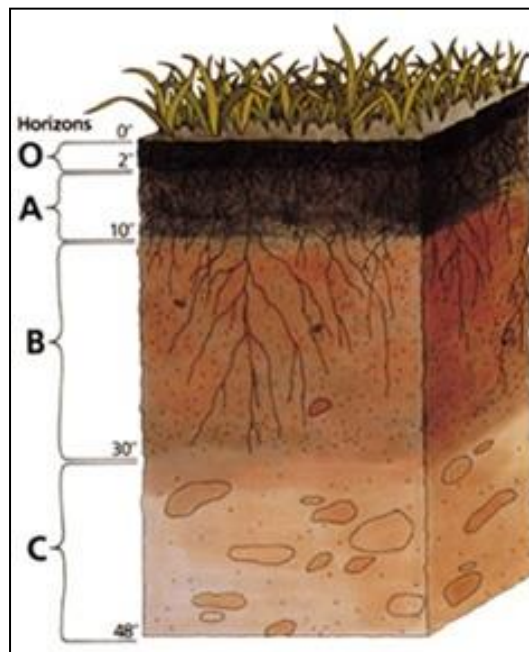


Fig. 1 : Les différents horizons d'un profil de sol (Anonyme, 2012).

O : Horizon organique ; A : Horizon organo-minéral ;

B : Horizon illuvial (enrichi d'éléments des horizons extérieurs) ;

C : Roche mère.

6. Propriétés physiques du sol

Les propriétés physiques sont multiples telles que la structure, la texture, la porosité et connectivité etc.

- **Structure** : La structure est l'assemblage des constituants solide, sa stabilité dépend de la matière organique dans sol. Le complexe argilo-humique joue un rôle structurale important selon les teneurs en eau et le type d'argile du sol. La matière organique

augmente la stabilité des agrégats. Une mauvaise structure peut donc empêcher l'écoulement des eaux dans le sol, les échanges gazeuses entre le sol et l'atmosphère. Une bonne structure assure une bonne circulation d'eau. Elle laisse s'écouler l'excès et assure une meilleure aération des racines et de germination. Ainsi que, la pénétration profonde des racines avec une bonne exploration des ressources nutritives du sol (Soltner, 2004).

- **Texture :** La texture du sol est à la base de toutes les autres propriétés, c'est la propriété du sol qui traduit de manière globale la composition granulométrique de la terre fine (Gobatet *al.*2010). La texture constitue un caractère fondamental du sol, car elle influe sur :
 - ✚ **Perméabilité du sol à l'eau et à l'air :** La perméabilité est indépendante du taux de la matière organique. Le critère retenu pour mesurer la perméabilité est la vitesse de percolation de l'eau exprimée en Cm^3/h . Cependant, le degré de décomposition de la MO a une influence, plus cette matière est décomposée, plus la perméabilité est faible (Redlich et Verdure. ; 1975).
- **Rétention de l'eau :** L'eau sous forme de vapeur ou de liquide occupe environ un quart du volume d'un sol. La teneur en air est complémentaire de la teneur en eau, puisque ces deux fluides se partagent le même espace.
- **Porosité :** La porosité d'un sol est une grandeur physique qui exprime le rapport entre le volume occupé par ses pores et son volume totale (Calvet, 2003).
- **Connectivité :** Elle exprime l'importance des connexions entre les pores qui est un déterminant de la continuité de la phase gazeuse et de l'écoulement de l'air.

Chapitre II

Généralités sur la microflore

II. Généralités sur la microflore

1. Définition de la microflore du sol

La microflore est constituée par les différents types de microorganismes vivants dans le sol tels que : les actinomycètes, les bactéries, les champignons, les algues unicellulaire etc. (tab.1). Ils peuvent représenter jusqu'à 90% de la biomasse du sol et ils sont impliqués dans la plupart des fonctions clés du sol.

Tableau 1 : Abondance et biomasse des organismes vivants du sol (Patricia, 2015).

Organismes	Nombre approximatif		Biomasse moyenne	
	Par 1 gr de sol sec	Par 1 m ²	En kg/ha Prof.20 cm	En%(sans Racines)
Bactéries	10 ⁸ - 10 ⁹	10 ¹³ - 10 ¹⁵	1500	25
Champignons	n.d	n.d	3500	59
Algues	1000 - 10 ³	10 ⁸ - 10 ⁹	10 – 1000	Traces
Protozoaires	10 ⁴ - 10 ⁶	10 ⁹ - 10 ¹¹	250	4
La faune sans protozoaires	0,1 - 1000	10 ⁵ - 10 ⁶	15000	12
Racines	n.d	n.d	6000	
Total	n.d	n.d	Env. 12000	100
n.d : non déterminable ; Env : Environ, Prof : Profondeur, gr : gramme.				

2. Présentation des microorganismes

2.1. Les algues

Les algues constituent un groupe d'organismes hétérogène (tailles, habitats et modes de reproduction etc.). Ce sont essentiellement des organismes aquatiques que l'on rencontre dans les eaux douces des lacs, des rivières, des étangs et dans les eaux salines des mers et des océans. Elles sont toutes caractérisées par leur photosynthèse (utilises la lumière comme source d'énergie) (Heuri, 1969 ; Xavier et Laurence, 1997).

2.2. Les protozoaires

Selon Dommergues et Mangenot, (1970), ce sont les premières formes animales, moins évoluées, ces organismes présentent une diversité morphologiques (dimensions, de structure et de fonctions). Ils dérivent de certaines algues unicellulaires dépourvus du pouvoir photosynthèse. La plupart d'entre eux sont mobiles. D'après, leur distribution est large dans la nature (aquatiques, végètent dans le sol ou prédateurs sur un autre organisme vivant).

2.3. Les champignons

Ils sont définis par leurs structures mycéliennes filamenteuses, caractérisés par des hyphes plus ou moins allongés et ramifiés. Ces filaments sont ressemblés à des tubes résistants et composés principalement de chitine (**Xavier et Laurence, 1997**). A leur intérieur se trouve une masse cytoplasmique mobile contenant de nombreux noyaux (cénocytique). Selon les modes de reproduction les champignons sont regroupés en quatre classes principales : les phycomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes (**Heuri, 1969 ; Dommergues et Mangenol, 1970**).

2.4. Les bactéries

Xavier et Laurence, (1997) et Jaune, (2011), rapportent que les bactéries vivent dans tous types de sols. Ce sont des procaryotes unicellulaire de formes très diverses (cylindrique, sphérique et spirille) et de taille qui varie de 1 et 2 μm .

2.4.1. Procaryotes photosynthétiques

Ils sont caractérisés par deux grands groupes les Cyanobactéries et les *Rhodobactéries* ou *Chlorobactéries* (bactéries rouge ou vertes) :

- **Les cyanobactéries** : Les cyanobactéries ou algues bleu-vert sont des procaryotes photosynthétiques. Certaines sont capables de fixer l'azote atmosphérique (fixatrices de N_2) ou non. Elles sont des producteurs primaires de matière organique. Elles ont des formes structurales très diverses unicellulaires et pluricellulaires filamenteux présentant des ramifications formant des thalles (**Ranjard et al., 2001**).
- **Les bactéries rouges ou vertes (*Rhodobactéries* ou *Chlorobactéries*)** : Ce sont des bactériochlorophylles qui possèdent des pigments spécifiques, mobiles, anaérobies (CO_2 source de carbone et des minéraux réduits H_2S , H_2). Selon **Roger et al., (2001)**, les *Chlorobactéries* et les *Rhodobactéries* nécessitent une écologie spéciale telles que les milieux riches en matière organique et sulfures (les bassins de décantation, les eaux riches en matière organique, les litières végétales aquatiques et certains sols hydro morphes). Elles jouent un rôle important dans le cycle du soufre.

2.4.2. Les bactéries non photosynthétiques

Elles présentent une grande variété de formes, peuvent être mobiles ou immobiles et résistantes par la présence de spores et Kyste ou non par l'absence de ces formes. Deux genres principaux abondants dans le sol chez les bactéries sporulantes *Bacillus* et *Clostridium*. Le genre *Bacillus*, très hétérogène, comprend des espèces anaérobies facultatives ou aérobies, alors que les *Clostridia* sont toutes des fermentaires anaérobies stricts. Les bactéries à Gram positif non sporulantes comprennent trois groupes principaux (**Davet, 1996**):

- Les bactéries lactiques fermentaires, donc anaérobies facultatives.
- Les bactéries méthanogènes, anaérobies strictes, utilisent le CO₂ comme accepteur final d'électrons et produisent du méthane.
- Les *Corynébactéries* de forme très variable, intermédiaires entre les bactéries et le grand groupe des actinomycètes

D'après Davet, (1996), de très nombreuses espèces des bactéries à Gram négatif hétérotrophes, peuvent utiliser une grande variété de composés organiques comme source de carbone et d'énergie. Ce groupe présente une importance agronomique comprend les genres fixateurs d'azote *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, etc.

3. Les communautés microbiennes et leur activité

Elles forment un ensemble de groupe d'organismes interagissant entre eux. Elles résultent de certains facteurs environnementaux, des processus intrinsèques et d'interactions (compétition, mutualisme) (**Allison and Martiny, 2008**). Elles se définissent par leurs biomasses, diversités, structures, et ses fonctions dans un écosystème donné. La biomasse microbienne est impliquée soit directement ou indirectement dans de nombreux processus biogéochimiques par la MO. Ce sont des indicateurs de la qualité biologique des sols.

3.1. Influence de la température

La physiologie des microorganismes et la structure des communautés peuvent être affectées par l'augmentation de la température, en modifiant ainsi les processus de décomposition (**Schimelet Gullede, 1998**). Ces changements d'activité des communautés auront un effet sur l'homogénéité des sols puisqu'elles n'ont pas tous la même tolérance à la température, elles vont répondre différemment à ce stimulus (**Rothschild et Mancinelli, 2001 ; Schimelet al, 2007 ; Standing et Killham, 2007**). **Zogg et al.(1997) et Coucheney et al.(2008)** ont observé que la température a un effet différencié sur les profils de métabolites de souches bactériennes extraites de sol. Également, l'augmentation de la température va influencer sur les dynamiques d'eau, de gaz et de nutriments dans les sols induisant un désordre d'effets (**Standing et Killham, 2007**).

3.2. Influence de la dynamique de l'eau et des gaz

L'eau est un élément essentiel pour le maintien de la vie des microorganismes dans le sol. La présence d'eau et sa dynamique dans les pores permet la diffusion des nutriments, d'enzymes, d'oligo-éléments et des gaz dissous. Ainsi que, la dispersion et la connectivité des communautés microbiennes et les autres êtres vivants (**Jocteur Monrozier et al, 1993 ; Ranjard et Richaume, 2001**). Toutefois, la connectivité entre les communautés microbiennes peut présenter des effets sur les ressources soit négatifs (prédation et la compétition), ou positifs par l'augmentation des échanges trophiques, de la communication cellulaire et des transferts de gènes (**DeAngelis et**

al., 2008). Les variations de teneur en eau dans les sols impliquent une adaptation des communautés microbiennes (dessiccation ; humectation). Pour celles qui vivent dans les macros pores, où l'eau est retenir par forces de capillarité, par contre, dans les micropores c'est le problème de la diffusion en oxygène qui se pose, en encourageant l'activité de microorganismes anaérobies. Ce qui conduit à une anoxie du milieu (**Moyano *et al.*, 2013**).

3.3. Influence de la quantité et de la qualité de la matière organique

La quantité et la qualité de la MO dépendent de la nature de la végétation, ce dernier est la source principale d'énergie des communautés microbiennes. Plusieurs études ont mis en évidence l'influence de la qualité des MOS sur les communautés microbiennes (**Zhou *et al.*, 2007**; **Marschner *et al.*, 2003**; **Lauber *et al.*, 2008**). Ces multiples recherches montrent que la composition des communautés microbiennes peut être influencer par la quantité de substances humiques (acides humiques et fulviques) et leur structure génétique dépendante des systèmes de culture, les différentes pratiques induisent une variation des résidus végétaux et de leurs qualité biochimiques (**Lejon *et al.*, 2007**).

3.4. Influence de la texture du sol

La texture du sol se caractérise par la composition granulométrique (répartition des minéraux par catégories de taille). Une comparaison de plusieurs sols a montré une corrélation entre la texture et les communautés bactériennes en association. Cependant, l'étude de **Groffman *et al.*, (1996)**, a exposé l'effet de la texture du sol sur la biomasse et l'activité microbienne est plus important que celui induit par les différentes plantes de couverture et que la texture d'un est fortement corrélée à la teneur en MO.

3.5. Influence du pH

Les fluctuations de pH déterminent la composition, la structure et la diversité des communautés microbiennes. Ils ont observé des changements dans les profils des acides gras phospholipidiques avec le pH du sol. Cela, conduisant à dire que le pH a un impact sur la structure des communautés microbiennes. D'autres, ont montré différentes corrélations entre pH de sol et biomasse, ainsi que entre, la ratio champignons/bactéries (**Fierer et Jackson, 2006** ; **Lauber *et al.*, 2008**).

4. Caractérisation du genre *Bacillus* sp

3.1. Définition du genre *Bacillus* sp

D'après Mayer, (2004), les *Bacillus* les Bacillus forment un genre de bactéries à gram positif. Elles sont aérobies stricts ou aéro-anaérobies facultatives, possédant une catalase. Ces bactéries sont faciles à cultiver et capables de produire des endospores qui leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables. Celles-ci donneront naissance à de nouvelles bactéries (Ait Abdlouahab, 2008).

Les *Bacillus* sont hétérotrophes, saprophytes et ubiquitaires. Elles sont fréquemment retrouvées dans le sol où certaines espèces ont un rôle dans le cycle du carbone et de l'azote. On peut aussi les trouver dans des denrées alimentaires. Les bactéries du genre *Bacillus* sont connues comme étant capables de former des inclusions intracellulaires sous des conditions de stress (exemple : déficit d'éléments tels que le phosphore, l'azote, l'oxygène combiné avec un excès en sources carbonées) .

Il en existe un grand nombre d'espèces avec des propriétés physiologiques et des habitats très variés (terre, poussière, etc). Il existe des espèces thermophiles, acidophiles, psychrophiles, alcalinophiles. Les espèces saprophytes sont responsables de multiples dégradations des produits alimentaires (caillage du lait, etc.). Certains d'entre eux ont des rôles utiles comme producteurs d'antibiotiques (tyrothricine, polymyxines, bacitracine) ou d'antifongiques (mycosubtiline) (Perry *et al.*, 2004).

3.2. Taxonomie

D'après Gugliandolo *et al.*(2003), la classification en bactériologie, du genre *Bacillus* appartient à :

- La famille : Bacillacées (Bacillaceae) ;
- L'ordre : Bacillales (Bacillales) ;
- La classe : Bacilles (Bacilli) ;
- Phylum : Firmicutes (Firmicutes).

4.3. Aspects morphologiques

La taille des *Bacillus* varie de 3 à 9 µm et 1 µm de large, de forme rectangulaire et mobile. Ils peuvent représenter un aspect isolés ou groupés en chaînes sous forme de "canne". De coloration au Gram positif (Harly *et al.*, 2003).

4.4. Culture

Ils se cultivent bien sur milieux ordinaires dans des larges limites de température (12-45°C) et de pH (6 - 8,5). La plupart se développent plus vite à une température de 30°C à 37°C. Leur culture est abondante et rapide (environ 24h) que ce soit sur un milieu liquide ou solide. Sur ce dernier

milieu, l'isolement des *Bacillus* forme des colonies volumineuses de diamètre de 5 mm (**Harly et al.,2003**).

4.5. Les intérêts de *Bacillus* sp

Les applications de *Bacillus* sp sont diverses grâce à leurs capacité de croissance rapide et leurs métabolites synthétisés. Ses enzymes sont très réponsus dans les industries agroalimentaires telles que les amylases dans l'industrie du pain, et aussi sont responsables de multiples dégradations des produits alimentaires (caillage du lait, etc.).Ou encore des protéases et cellulases, dans l'industrie des détergents. Sa capacité d'antifongiques (mycosubtiline) ou produire des antibiotiques, comme la bacitracine en fait un organisme d'intérêt également pour l'industrie pharmaceutique (**Perry et al. 2004**).

Chapitre III

Les enzymes

III. Les enzymes

1. Définition des α -amylases

Les amylases sont de enzymes de nature protéique, ces biocatalyseurs sont classés parmi les enzymes industrielles les anciennes et importantes. Ces macromolécules appartiennent à la classe hydrolases des protéines globulaires, de type endoglycanases. Elles agissent sur les liaisons α (1- 4) de l'amidon. Son action donne des mélanges de glucose, de maltose et de dextrines. A la fin de la réaction, elle fournit du glucose et des résidus correspondant aux liaisons α (1-6) situées aux points de ramification des chaines (**Raimbault, 1981 ;Alaiset al., 2008**).

2. Nomenclature

Le tableau 1 récapitule les différentes nomenclatures d' α -amylase.

Tableau 2 : Différentes nomenclatures d' α -amylase (**Mercier, 1985**).

Nom systématique	α (1 - 4) D-glucaneglucanohydrolase
Non codifié	E.C .3.2.1.1
Nom recommandé	Alpha-amylase.
Synonymes	glycogenase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A, takatherm, thermolase, amylotherm, clarase, amylopsin, spitase CP1, G995, kleistase L1, THC 250, maxamy, ptyalin

3. Différentes origines

Les origines des amylases exploités industriellement sont différentes peuvent être d'origine animale, végétale ou des microorganismes. Malgré leurs différentes origines, et les quelques peu de séquences d'acides aminés, ces protéines partagent la même organisation de la structure tridimensionnelle et leur site actif similaires (**Mercier, 1985**). Leur chaîne polypeptidique est organisée en trois domaines formé chacun d'un tonneau de huit segments bêta, entourés par huit hélices alpha. Leurs sites actifs sont constitués d'un ensemble de sous-sites (**Scriban, 1999**).Cependant, les sources microbiennes sont les plus préférées dans la production à grande échelle (**Haqet al. 2002**).

3.1. Origine végétale

Les α -amylases jouent chez un rôle important dans le métabolisme glucidique. Ce sont des biocatalyseur des substrats tels que l'amidon, ou son d'hydrolyse produit des sucres réducteurs simples comme le glucose et le maltose qui sont soit directement assimilables ou indirectement. Dans la plus part des cas cette enzyme végétale est extraite à partir des céréales

(blé, l'orge, le son ou le riz). Au cours de la germination de l'activité enzymatique se déclenche pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon (Charles *et al.* 2003 ; Badot et Merlin, 1984 ; Srinivasa Rao *et al.*, 2004).

3.2. Origine microbienne

Deux types sont distingués chez les microorganismes les α -amylases bactériennes et les α amylases fongiques (tab.3).

Tableau 3 : Différentes α -amylases microbiennes et leur action (Liese *et al.*, 2000).

Enzyme	Source	Action
α -amylase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Aspegillus Saccharomyces</i>	Hydrolyse des liaisons α -(1,4) au hasard à l'intérieur de la chaîne, en donnant de l' α - dextrine, de maltose et de glucose.
α -amylase saccharifiante	<i>Bacillus subtilis</i>	Comme la précédente, sauf qu'elle produit jusqu'à 50% du glucose.

- **Les α -amylases bactériennes** : Principalement, ce type d'enzymes est obtenu par la fermentation de *Bacillacée*. Il s'agit de *Bacillus licheniformis* et *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* respectivement selon Mc Tighe *et al.*, 1995 et Bousseboua, 2002.
- **Les α -amylases fongiques** : La première production d' α -amylase a été réussie par Takamine en 1894 sur genres *Aspergillus* et *Penicillium*, l' α -amylase fongique est d'une thermo-stabilité assez faible ($T = 50^{\circ}\text{C}$ et 55°C). (Fogarty et Kelly, 1994 ; Duo-Chuan *et al.*, 1997). Maintenant, d'autres genres sont utilisés pour la production d' α -amylase relativement thermostable dont quelques levures, *Rhizopus* et *Alternaria* (Lateef *et al.*, 2004 ; Ait Kaki *et al.*, 2012).

3.3. Origine animale

Chatterton *et al.* (1996), l' α -amylase d'origine animale est extraite du pancréas des mammifères, tels que les porcs et les veaux. Les amylases d'origines animales, leurs production et utilisations moins fréquentes par rapport aux amylases microbiennes et végétales.

4. Structure et mécanisme d'action

La figure ci-dessous montre que la structure des α -amylases renferme des séquences d'acides aminés (environ 478 AA) répartis en deux domaines globulaires appelés A et B dont leurs nombre de résidus varient de 1-380 et de 381-478 résidus hydrophobes respectivement (fig.

2). La partie glucidique est formée de mannose, le site de fixation et catalytique sont localisés dans le domaine A. Pour les α -amylases, ce site (A) est formée de huit feuillets β plissés et de huit hélices α (Chiba, 1988).

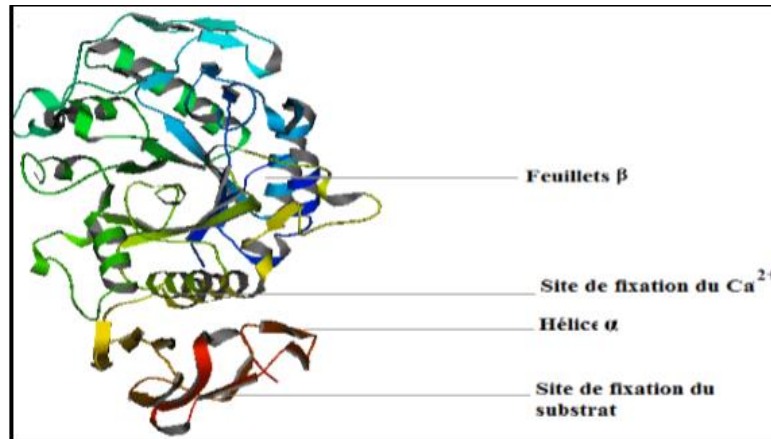


Figure 2: Structure tridimensionnelle de l' α amylase (Priestle, 1988).

Le mécanisme d'action de l' α -amylase sur la rupture des liaisons osidiques implique une série des échanges de protons entre le site de fixation le substrat et le site catalytique. Deux groupes sont impliqués dans la réaction du site actif, le groupement d'acides carboxyliques et le noyau imidazole. Ces échanges nécessitent la participation d'une fonction nucléophile du site actif, un stabilisateur de la charge positive de l'atome attaqué et un donneur de proton au groupe déplacé (Nielson *et al.*, 2001).

5. Caractéristiques spécifiques des amylases

Comme toutes les macromolécules biocatalytiques, les amylases exigent des conditions expérimentales particulières telles que : la température, le pH, la taille et la structure du substrat.

5.1. Spécificité de substrat

Le substrat naturel spécifique des amylases est l'amidon. Cet oligosides est formé des unités de glucose α (1- 4), formant des chaînes hélicoïdales d'amylose. Lesquelles de courtes chaînes identiques se branchent par des liaisons osidiques α (1-6). (D'après plusieurs auteurs Leveau et Bouix, (1993), la synthèse ou la répression de certaines enzymes est contrôlé par leurs substrats naturels. Ce cas a été observé aussi pour les amylases produites par certaines souches d'origine fongiques (*Aspergillus sp*, *Rhizopus sp.* et *Penicilium sp.*) (Nouadri, 2011).

5.2. Température optimale

La température optimale des α -amylases est comprise entre 25 et 70 °C, avec une grande stabilité thermique pour les α -amylases bactériennes (50 à 90 °C), avec possibilité de résistance à des températures dépassant 100 °C, pour celles isolées des souches hyperthermophiles. Bien que, la température optimale des α -amylases fongiques varie de 40 à 60 °C avec un optimum de 65 °C pour l' α amylase de la souche *Rhizopusorysae* (Lucio *et al.*, 1996 ; Larpent-gourgaud et Sanglier, 1992 ; Vertiani *et al.*, 1998).

5.3. PH optimal

La gamme de pH des amylases est de 4 à 9, sont stables avec un optimum de 4 à 5 pour les amylases fongiques, et de 6 à 8.5 pour bactériennes (Larpent-gourgaud et Sanglier, 1992).

5.4. Ions métalliques

Les α -amylases sont des enzymes allostériques, leurs activités catalytiques dépendent d'un activateur qui est un ion métallique Ca^{2+} . Il participe indirectement à la formation du complexe enzyme-substrat ou il participe dans la stabilité de l'enzyme contre la dénaturation thermique et protéolyse. De ce fait la conformation optimale de l'activité enzymatique sera maintien, contrairement aux autres ions tels que K^+ , Na^+ et NH_4^+ qui ne modifient pas l'activité des amylases et de EDTA et les métaux lourds qui inhibent fortement leurs fonctions (Savcheko *et al.*, 2002 ; Talamond *et al.*, 2002 ; Peixoto-Nogueira *et al.*, 2008).

Partie 2

Etude expérimentale

Chapitre IV

Matériel et Méthodes

IV. Matériel et méthode

1. Objective

L'objectif principal du travail porte sur l'isolement, l'identification et la sélection des isolats producteurs des amylases du genre *Bacillus* sp à partir du sol de culture céréalière (l'avoine) (fig. 3, A) de la région de Hassi mameche wilaya de Mostaganem.

2. Protocole expérimental

La figure ci-dessous représente le protocole expérimental.

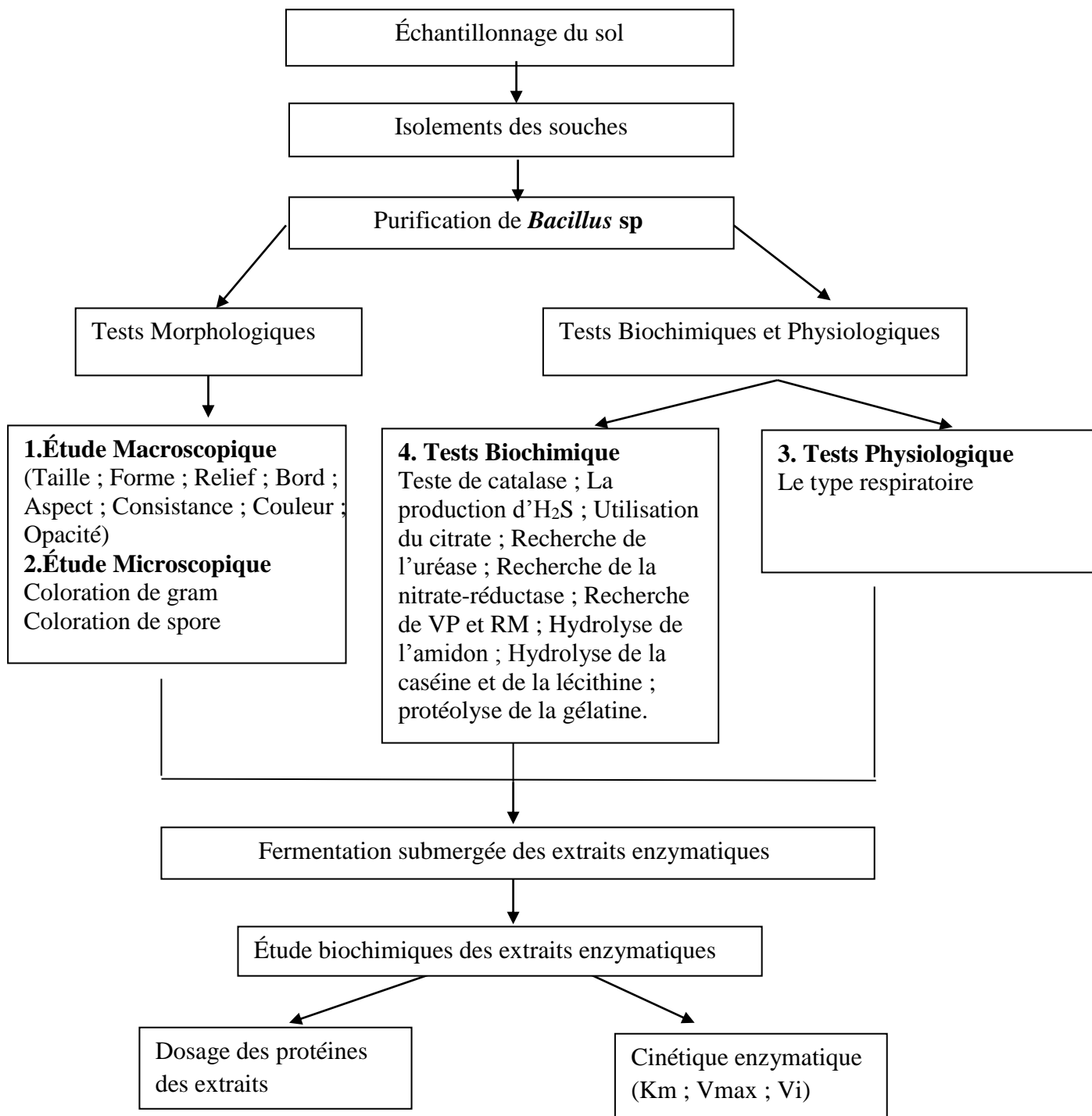


Fig. 3 : Protocole expérimental général.

3. Description du site de prélèvement

L'échantillon du sol utilisé pour cette analyse a été prélevé le 10 Février 2019 à Hassi mameche, wilaya de Mostaganem. C'est un terrain légèrement plat qui s'étend à 35° 51 37, 0° 04 23 Est ; il présente une superficie de 100 m². (fig. 4, B).

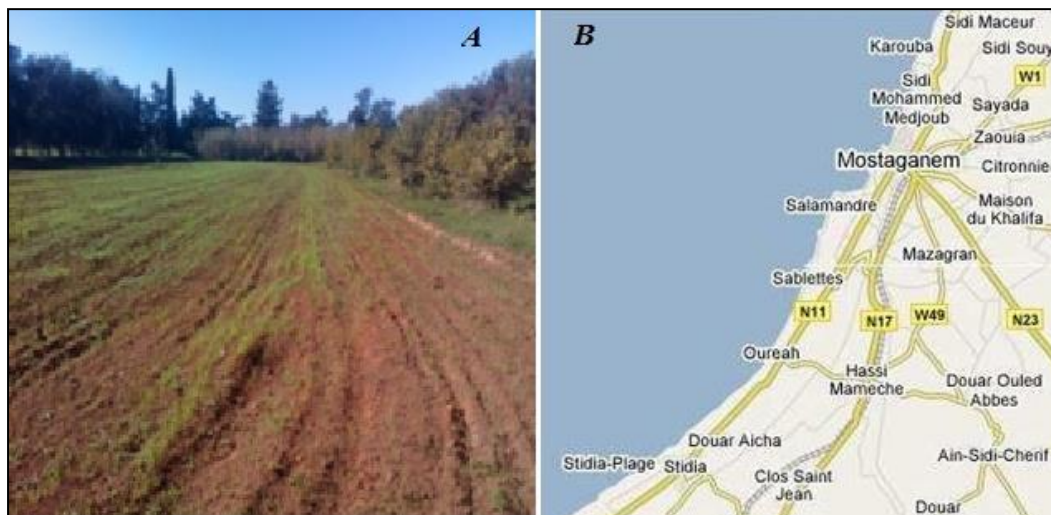


Fig. 4 : Présentation du site des prélèvements.

A : La zone de l'avoine ; B : Carte géographique région de Hassi mameche (W. Mostaganem)

4. Prélèvement des échantillons

Les prélèvements des échantillons de sol présentent une culture de céréales d'avoine. La technique de prélèvement de cinq points a été utilisée, elle consiste à limiter un espace d'environ 100 m². Ensuite, cinq positions espacées de 50 m² ont été ciblées pour les prélèvements des échantillons de sols. Après, à proximité des racines végétales et à l'aide d'une spatule stérile enfoncer dans le sol à une profondeur de 0 à 20 cm, les échantillons ont été prélevés et placés dans des récipients stériles et étiquetés (fig.5).

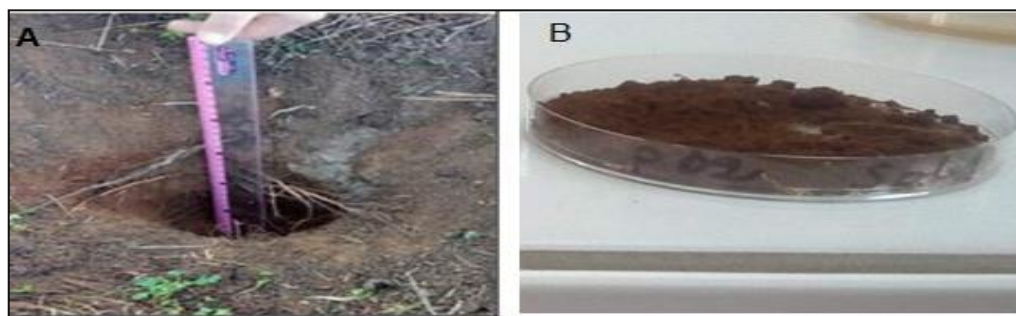


Fig. 5 : le site de prélèvement à Hassi mameche (A : la profondeur d'échantillon (20cm) ; B : échantillon de sol pour l'analyse)

5. Méthodes d'étude

5.1. Préparation des suspensions de sol

La dilution est un processus qui consiste à réduire la concentration d'une substance dans une solution. Les dilutions décimales des échantillons à analyser ont été effectuées selon la norme du journal officiel de la république algérienne 2004. A l'aide d'une micropipette de 1000 μ l une série de dilution a été préparée pour l'échantillon de sol de 10^{-1} à 10^{-5} . En prélevant 1g du sol et le plaçant dans 9ml d'eau physiologique dans un tube à essai stérile pour obtenir une solution mère. Puis à partir de cette suspension 1ml est prélevé et transvasé dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile (dilution 10^{-1}). La même opération a été répétée jusqu'à obtention de la dilution 10^{-5} (fig. 6, A et B).

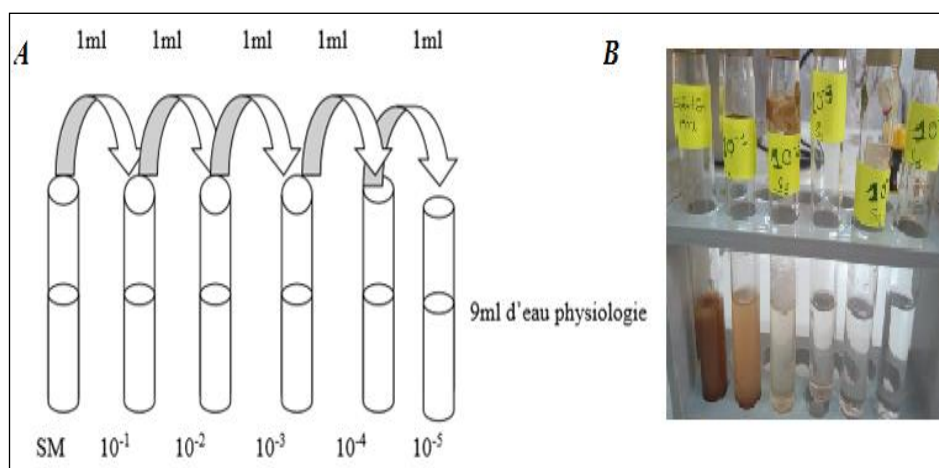


Fig. 6 : Techniques de dilutions de sol (Ulacio *et al.*, 1997).

A : Méthode de dilution ; **B :** Aspects des différentes dilutions du sol (10^{-1} – 10^{-5}).

5.2. Test de thermorésistants des dilutions et l'isolement des bacilles

Les différentes dilutions (10^{-3} à 10^{-5}) sont soumis à un traitement thermique dans un bain marie à 80°C pendant 10 min, avant l'ensemencement sur le milieu GN. Ce prétraitement permet de tuer les formes végétatives et l'isolement sélectif des formes sporulés des *Bacillus* (Burgess *et al.*, 2010 ; Delgado *et al.*, 2013., Zhao *et al.*, 2013).. Ensuite, les tubes sont introduits dans un bain d'eau glacée. En fin, l'isolement des cultures sont réalisées par l'ensemencement de 0,1 ml (3gouttes) de chaque dilution en surface. Ces dernières sont incubées à 30°C pendant 24 à 48heures.

5.3. Purification

Après incubation, l'aspect des colonies des *Bacillus* ayant poussés sur les milieux de cultures sont examinés selon leurs aspects macro et microscopiques. Selon la nécessité et si les boîtes contiennent toujours plusieurs types de colonies différentes que celles des *Bacillus*, on procède à la purification de la souche encore une fois en réalisant des repiquages successifs sur le même milieu d'isolement.

6. Identification des souches

L'identification des souches est réalisée après des examens macroscopiques et microscopiques et par l'étude de quelques caractères biochimiques.

6.1. Etude macroscopique

L'examen macroscopique des cultures isolées est le premier aspect de l'identification. Il consiste à observer directement à l'œil nu et à la loupe binoculaire (4×10 Zeiss 475022), la morphologie des colonies obtenues sur gélose nutritif (Ripert., 2013). Après 24 à 48 heures d'incubation les critères des suivants ont été pris en compte :

- La taille : Elle peut être mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies.
- La forme des colonies : circulaire, filamenteuse, irrégulière, ronde, étoilée...
- Le relief : plane, élevée, convexe, bombée, bossue...
- Le bord : régulier ondulé lobé, dentelé, filamenteux, bouclé
- L'aspect : duveteux, poudreux, granuleux...
- La consistance : molle, élastique, cartonnée ...
- La couleur de la culture et de son verso
- L'opacité : les colonies sont soit opaques et ne laissent pas passer la lumière, translucides en laissant passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers, comme le verre dépoli ou transparentes (laissent passer la lumière et voir les formes au travers)

6.2. Etude microscopique

L'observation microscopique a été effectuée selon Alexandre *et al.*(2008), elle permet de définir certains caractères morphologiques et organisationnels des bactéries : forme (coque, bacille ou spirale), taille, le mode de regroupement (organisés en chaînette ou isolés), le Gram, la mobilité et la position de la spore.

- **La coloration de Gram des bactéries** : C'est la double coloration en bactériologie qui permet de distinguer les bactéries Gram positif et gram négatif, selon de la composition chimique de leur paroi. Les cultures jeunes, de 24 heures isolées sont fixées sur des lames et observées au microscope optique au faible jusqu'au fort grossissement. Recouvrir la lame par le violet de gentiane, laissé agir une minute et rincer à l'eau distillé. Après ajout de la solution de Lugol

pendant 45 secondes, un rinçage à l'eau distillée suivi d'une décoloration rapide à l'alcool puis l'eau. Contre coloration, recouvrir la lame avec de la Fuch sine et laisser agir une minute, et rincer à l'eau distillé. L'observation sous microscope (Gx100) en présence d'une goutte d'huile d'immersion (**Perryet et al., 2004; Camille,2007**). L'apparition de couleur violette les bactéries sont dites à Gram positif. La paroi des bactéries à Gram négatif apparaissent colorées en rose.

7. Tests biochimiques

7.1. Test de la catalase

Principe : Certaines bactéries ont la faculté de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En présence d'une bactérie productrice de catalase, on observe à partir de l' H_2O_2 une libération d'oxygène gazeux selon la réaction : $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$ (**Denis., 2007**).

Technique : A l'aide d'une anse de platine stérile on prélève une colonie bien isolée et on la dépose dans une goutte d'eau oxygénée H_2O_2 sur une lame bien propre.

Lecture : La présence de la catalase se traduit par le dégagement immédiat de bulles d'oxygène, et

L'absence de la catalase se traduit par l'absence de bulles d'oxygène.

7.2. La production d' H_2S

Principe : Le milieu utilisé est le TSI, une gélose inclinée dont le glucose, présent dans le culot, est attaqué par la voie fermentative entraînant une acidification du milieu avec ou sans production de gaz. Sur la pente, le lactose et le saccharose seront alors oxydés et fermentés. La production de l' H_2S se manifeste par un noircissement du culot.

Technique : A partir d'une suspension bactérienne et à l'aide d'une anse de platine stérile on prélève aseptiquement une colonie et on réalise une pique centrale et des stries serrées sur la pente. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 24heures. (**Jean N et Guy Leyral., 2006**)

Lecture : Lactose-saccharose positifs : pente virant au jaune ; Glucose positif : culot jaune ; H_2S positif : noircissement du milieu dans la zone joignant la pente et le culot ; Production de gaz : présence des bulles de gaz dans le culot.

7.3 Utilisation du citrate

Principe : Ce test est réalisé sur le milieu citrate de Simmons. Il est basé sur la capacité de la bactérie à utiliser le citrate comme une seule source de carbone suite à la présence d'une enzyme citrate perméase (**Cheesbrough., 2006**).

Technique : On utilise une culture pure et jeune (de 15 à 18heures) comme source d'ensemencement. Une seule colonie isolée est ensemencée sur la surface de la pente par des stries serrées. Le milieu est incubé 24heures à 30°C (**Mac Williams, 2009**).

Lecture : Une croissance sur le milieu accompagnée d'un virage de sa couleur du vert au bleu indique un résultat positif (présence d'un citrate perméase). L'absence de croissance est un résultat négatif.

7.4. Recherche de l'uréase

Principe : La recherche de l'uréase s'effectue sur milieu urée-indole. L'urée sous l'action d'une uréase bactérienne est transformée en carbonate d'ammonium alcalin entraînant une coloration rouge du milieu (**Denis, 2007**).

Technique : On transfère le contenu d'une ampoule du milieu urée-indole dans un tube vide stérile, puis on ensemence avec une à deux gouttes de suspension de la souche à identifier. Le tube est incubé à 30°C pendant 24heures.

Lecture : L'uréase positive se traduit par l'apparition d'une coloration rose à rouge violacée tandis qu'une uréase négative est caractérisée par une teinte jaune orangée.

7.5. Recherche de la nitrate-réductase

Principe : Les bactéries qui possèdent une nitrate-réductase, sont capables de transformer les nitrates en nitrites et éventuellement en azote.

Technique : Un bouillon nitraté (bouillon nutritif supplémenté de 1,5% de nitrate de potassium) est ensemencé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne à étudier. Le bouillon est incubé à 30°C pendant 24heures.

Lecture : Après incubation, 3 gouttes d'une solution d'acide sulfanilique (Griess A) et 3 gouttes d'une solution naphtylamine (Griess B) sont ajoutées au bouillon. Si une coloration rose fugace apparaît, les nitrates sont réduits en nitrites. En absence de coloration, les nitrates sont réduits au stade nitrites, soit réduits au stade azote, ou la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. L'addition de poudre de zinc (qui va réduire les nitrates en nitrites) permet de trancher. Si une coloration rose apparaît, alors la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. Si aucune modification de coloration n'est visible après ajout de zinc, alors les nitrites avaient été réduits au stade azote (**Denis., 2007**).

7.6. Recherche de métabolites formés à partir de l'acide pyruvique

Principe : Le milieu Clark-Lubs contenant de l'acide pyruvique permet l'étude des produits de fermentation du glucose. La différenciation entre la formation d'acide formique et d'acide acétique (RM) et la formation d'acétoïne ou d'acétylméthylcarbinol (VP) (**Denis, 2007**).

Test RM (rouge de méthyle) : Le rouge de méthyle est un indicateur de pH avec un intervalle compris entre 6 (jaune) et 4.4 (rouge). Ce test permet la mise en évidence de la production des acides forts (acide lactique, acide acétique, acide formique) à partir de glucose par la voie de fermentation d'acide mixte (Winn *et al.*, 2006).

Test VP : Ce test détecte la production du carbinol acétylé de méthyle (acétoïne), un produit naturel formé à partir d'acide pyruvique au cours de la fermentation du glucose. L'acétoïne en présence d'oxygène alcalin et atmosphérique est oxydé en diacétylé qui réagit avec l'alpha-naphtol pour produire la couleur rouge (Parija, 2009).

Technique : Un milieu Clark et Lubs est ensemencé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne, puis incubé 24 heures à 30°C.

Lecture : Après incubation, 2 ml de milieu sont prélevés auxquelles on ajoute 1 à 2 gouttes du réactif RM. De même, 0,5 ml de KOH ou de NaOH (réactif VP 1) et 0,5 ml d'alpha-naphtol (réactif VP 2) sont ajoutés à un volume de 1ml du milieu prélevé dans un autre tube stérile.

➤ **Test RM :** Si le tube présente une coloration rouge le test RM est positif. Dans le cas où la couleur est jaune le test est négatif.

➤ **Test VP :** Le tube présentant une coloration rouge est dit positif. Un test négatif est caractérisé par une couleur jaune.

7.7. Test de l'hydrolyse de l'amidon

Principe : L'amidon est un polysaccharide, constitué d'amylose et d'amylopectine. La gélose à l'amidon est une gélose nutritive, additionnée de 1% d'amidon de pomme de terre. Elle permet de mettre en évidence la dégradation de ce polysaccharide par certaines espèces appartenant notamment au genre *Bacillus*.

Technique : Les boîtes contenant le milieu sont ensemencées par une strie médiane avec les souches à caractériser. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 24 heures.

Lecture : L'hydrolyse de l'amidon s'exprime par un halo d'éclaircissement autour de chaque colonie l'observation est plus nette en inondant la surface du milieu avec du Lugol (solution iodurée). Zone claire jaunâtre (couleur du Lugol autour des colonies) : amidon hydrolysé test positif. Présence de zone bleue : amidon non hydrolysé (négatif) (Delarras, 2014).

7.8. Test d'hydrolyse de la caséine

Principe : La caséine, protéine du lait, peut être hydrolysée par certaines espèces bactériennes ; la recherche de l'activité caséolytique est notamment utile dans l'identification des *Bacillus*.

Technique : Le milieu gélose au lait est ensemencé par une strie centrale à partir d'une suspension des souches isolées. L'incubation est réalisée à la température adéquate 30°C pendant 24 heures.

Lecture : Les zones d'éclaircissement du milieu autour des colonies traduisent un résultat positif. L'absence de telles zones exprime un test négatif (Delarras, 2014).

7.9. Hydrolyse de la lécithine

Ce test est réalisé par ensemencement de la souche en une seule strie sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile (Annexe). L'apparition de toute zone claire autour de la culture avec l'opacification dans le milieu après 24 à 72 heures d'incubation à 30°C, témoigne que la souche possède la lécithinase (De Vos *et al.*, 2009).

7.10. Protéolyse de la gélatine :

La gélatine est un produit protéiné obtenu par hydrolyse partielle du collagène. Ce test est utilisé pour la mise en évidence de l'enzyme gélatinase. Il est étudié sur gélose nutritive additionnée de gélatine à raison de 4g/l. Couler le milieu gélose à la gélatine en boîte de pétri, ensemencer en touche ou en stries par anse à la surface du milieu étant bien sèche, et incuber à 30°C pendant 24 h. Après l'incubation, verser sur le milieu 1 ou 2ml du réactif chlorure de mercure II.

- Résultat positif : gélatinase présente : absence de précipité blanchâtre autour de la strie d'ensemencement démontre l'absence de gélatine dans cette zone.
- Résultat négatif : absence de gélatinase : il se traduit un précipité blanchâtre partout où la gélatine n'a pas été hydrolysée.

8. Le type respiratoire

Technique : Sur une gélose profonde viande foie (VF) coulés dans des tubes. Au moment de l'emploi, la gélose est régénérée par chauffage au bain marie bouillant pendant 30 minutes, puis maintenue en surfusion à 45°C. L'ensemencement de la souche est effectué à l'aide d'une pipette pasteur qui est plongée au fond du tube, puis remontée en décrivant une spire, de façon à ensemer uniformément le milieu. Après refroidissement et solidification du milieu, les cultures sont incubées à 30°C pendant 72 heures.

9. Production d'amylase par fermentation submergé

9.1. Préparation de l'inoculum

La souche de *Bacillus* sp déjà identifiée est ensemencée en surface sur le GN. La culture est incubée à 30°C pendant 48 h. Après la sporulation, les spores sont mises en suspension par l'addition de 10 ml de l'eau distillée stérile et agitation vigoureuse. La suspension sporulée va servir à l'inoculation des milieux de culture d'extraction. Le comptage des spores a été estimé par mesure de l'absorbance à $\lambda = 600$ nm à l'aide d'un spectrophotomètre (6715 UV-visible. JENWAY). La suspension de spores est diluée à l'aide d'eau distillée stérile jusqu'à

obtenir une densité optique d'environ $DO = 1,5$ qui correspond environ à une concentration de 10^7 CFU/ml.

9.2. Inoculation des milieux de fermentation

Le milieu de cultures précédemment préparés est inoculé par 5 ml de la suspension sporulé (10^7 spore/ml) de l'isolat de *Bacillus sp* sélectionné dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml du milieu liquide à base d'amidon. Ensuite, ils sont incubés à 30°C pendant 48h sous agitation continue à une vitesse de 120tours pendant 48 heures (Khwaja, 2011).

9.3. La fermentation submergée et extraction de l'enzyme

La fermentation submergée est une fermentation où le substrat est soluble, permettant une bonne homogénéisation des composants de milieu (Oomah, 2011).

Après le 2^{ème} jour, la culture a été filtré à travers du papier filtre Whatman et en présence de acétate de sodium (0,05 M). Le filtrat a été centrifugé à 4000 tours pendant 10 minutes pour éliminer le culot. Le surnageant a été recueilli sous forme d'enzyme brute et utilisé pour l'estimation de l'enzyme amylolytique et l'étude cinétique.

10. La cinétique des extraits enzymatiques

10.1. Dosage colorimétrique des extraits enzymatiques par la méthode de Biuret

En milieu alcalin le cuivre divalent réagit avec les liaisons peptidiques des protéines pour former le complexe du biuret, de coloration violacée. Les acides aminés isolés et les dipeptides ne forment pas de composé coloré en présence de cuivre (CuSO_4), deux liaisons peptidiques adjacentes sont nécessaires. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration en protéines. Le tartrate de potassium et de sodium empêche la précipitation de l'hydroxyde de cuivre et l'iodure de potassium (KI) empêche l'auto-réduction du cuivre.

Mode opératoire

- Préparer de la solution mère d'ovalbumine à 0,5g/100ml d'eau distillée
- Préparer des dilutions à partir de la solution mère : 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ml compléter à 4 ml d'eau distillée.
- Ajouter 4 ml du réactif Biuret, agiter et incubé à 15 mn à température ambiante
- Mesurer l'absorbance à une longueur d'onde 540 nm en utilisant un spectrophotomètre UV- visible.
- On trace la courbe de la densité optique en fonction de la quantité d'ovalbumine pour quantifier l'extrait enzymatique.

10.2. Préparation de la gamme d'étalonnage du glucose

Une gamme de dilution de glucose a été préparée pour mettre en évidence le sucre réducteur libéré à partir de l'amidon après l'hydrolyse enzymatique. Cette réaction est basée sur l'intensité de la coloration du réactif Fehling en fonction de la quantité de sucres réducteurs.

Mode opératoire

La préparation des différentes dilutions (0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ml) ont été effectuées à partir d'une solution mère du glucose de concentration 1g/L.

- Ajouter 1ml de tampon acétate de sodium à 0,5M
- Ajouter 5 ml du réactif Fehling.
- Chauffer les tubes pendant 5 minutes dans un Bain-marie à 40°C
- Ajouter 3 ml de l'eau distillé dans les tubes ; laissé refroidir pendant 3 minutes
- Mesurer l'absorbance DO à 540 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible
- Tracer la courbe de la densité optique en fonction de la de glucose oxydé en μmol

[DO = f (C)].

10.3. La cinétique des extraits enzymatiques

La cinétique enzymatique a pour objet d'identifier et de décrire la transformation du substrat amidon en présence de l'extrait de *Bacillus*, à travers la détermination des paramètres cinétiques K_m , V_{max} et V_i à un pH constant (pH=5) et température optimale (40°C).

Mode opératoire

- Ajouté 3ml de la solution du substrat (solution de amidon) ;
- Ajouté 1ml du tampon acétate à pH 4,7 ; et prés incubation 5 minutes à 30°C ;
- Ajouté 3 ml de réactif Fehling et 1 ml de l'extrait enzymatique ; après agitation
- le mélange est incubé à 30°C pendant (0 à 12 min) ;
- Ajouté 4 ml de réactif Fehling ; et homogénéiser, boucher les tubes avec le
- papier et porter 5 min au bain marie bouillant, et laisser refroidir ;
- Ajouté 6 ml d'eau distillé ;
- Agiter et laisser reposer 10 minutes à température ambiante.
- Lire la densité optique DO à 600 nm contre un essai à blanc. La concentration des sucres réducteurs correspondants est déterminée à partir de courbe étalonnage établie avec des concentrations du glucose différentes.

Les préparations des solutions réactifs Fehling, solution du substrat et le tampon acétate sont détaillées en annexe.

La variation de la concentration en substrat (amidon) dans le milieu réactionnel et dans des conditions optimales (pH et température) permet de déterminer les paramètres cinétiques K_m et V_{max} de l'amylase et V_i . L'utilisation de la courbe d'étalonnage du glucose comme référence permet de calculer la concentration du produit libéré après hydrolyse du substrat amidon par l'extrait enzymatique de *Bacillus*. L'équation suivante de Michaelis-Menten a été employée pour évaluer la constante vitesse initiale de la réaction enzymatique.

$$V_i = V_{max} * [S] / V_{max} + [S]$$

- **V_i** : Vitesse initiale d'oxydation ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
- **V_{max}** : Vitesse maximale d'oxydation ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
- **[S]** : Concentration en substrat (Amidon) (mol.l^{-1})
- **K_m** : Constante de Michaelis (mol.l^{-1}) ; elle correspond à la valeur de [S] pour laquelle $V_i = V_{max}/2$.

Chapitre V

Résultats et Discussion

V. Résultats et discussion

1. Aspects morphologiques des *Bacillus* sp

1.1. Aspects macroscopiques

Après l'isolement et plusieurs purifications, les colonies bactériennes développées sur le milieu GN sont caractérisées selon leurs aspects macroscopiques (tab.4).

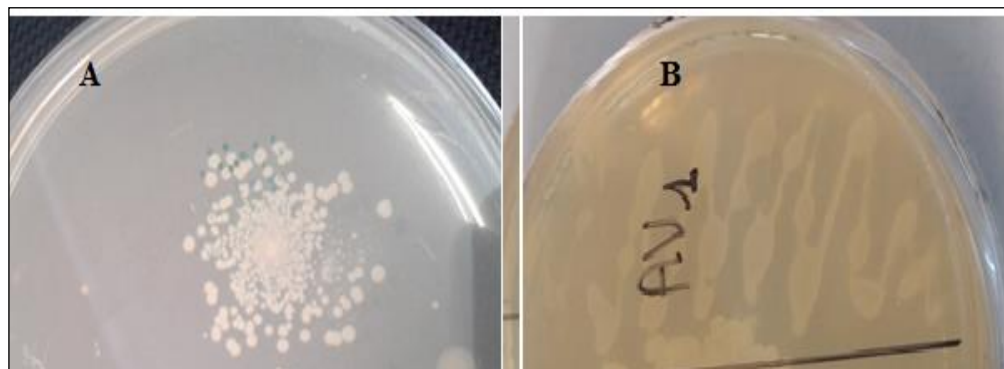


Fig. 7 : Aspect macroscopique des colonies des *Bacillus* sp.

A : Colonies après isolement ; **B :** Colonies après purification.

Tableau4 : Aspect morphologique des colonies obtenues sur GN après 24h d'incubation.

Souche	Forme	Élévation	bords	Opacité	Consistance	Couleur
<i>Bacillus spp</i>	Circulaire	Élevée	réguliers	translucide	Crémeuse	Beige

Les colonies sont circulaires, élevées à bords réguliers et crémeuses. De couleur beige translucide (fig. 4). Cette caractérisation est en accord avec la description qui a été établi par (Madiganet al., 2006) ces caractères sont conforme à ceux des bacilles thermophiles .

1.2. Aspects microscopiques

L'aspect microscopique a été observé à l'état frais et après la coloration de Gram. Cette observation a révélé que la souche se présente sous forme de bâtonnets, de petites tailles droites. Leurs extrémités arrondies sont regroupés sous formes de diplobacilles ou chainettes à Gram positifs (fig. 8). Elles sont soit mobiles ou immobiles avec une endospore ovale, sub-terminale, non déformante. D'après Gugliandoloet al., (2003), les *Bacillus* possèdent la capacité de produire les spores qui vont permettre de résister aux conditions défavorable . Ces cellules ont une forme d'une petite sphère dont la paroi est épaisse.

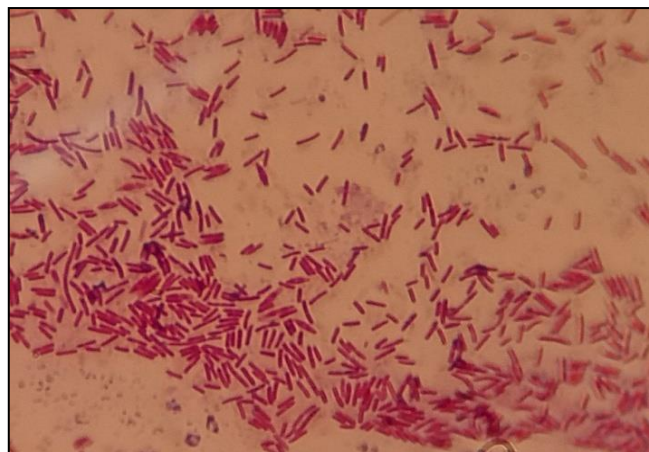


Fig. 8 : Aspect microscopique des cellules des *Bacillus sp* coloration de gram (G100x).

2. Résultats des tests biochimiques

Pour l'identification de la souche, nous avons fait recours à la galerie classique. Les résultats des tests biochimiques sont représentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Les résultats des tests biochimiques.

Les caractères biochimiques	La souche
Catalase	+
Citrate	+
H ₂ S	-
Production de gaz	-
Uréase	-
Nitrate réductase	+
VP	+
RM	+
VP : Voges-Proskauer ; RM : Rouge de Méthyle ; + : présence ; - : absence.	

Les résultats du test de la catalase pour l'étude du type respiratoire ont montrés que la souche isolée est catalase positive (tab.5, fig. 9, A).

La réaction se traduit par le dégagement immédiat de bulles d'oxygène, cela signifie les bactéries sont des aérobies (fig.9, A). Ce résultat a été déjà confirmé par **Oren, (2002)**.

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 5 on remarque que la souche est de VP positif cela traduit la produire l'acétoïne et de RM positif (formation des acides forts). Cela permet à la souche d'utiliser le citrate comme source de carbone et d'énergie. Le métabolisme du citrate est lié à la présence d'un citrate perméase. On a remarqué l'absence de l'uréase, ainsi que

l'enzyme responsable de l'hydrolyse de tryptophane en indole chez la souche. En revanche, les bacilles présentent une réaction positive de nitrate réductase.

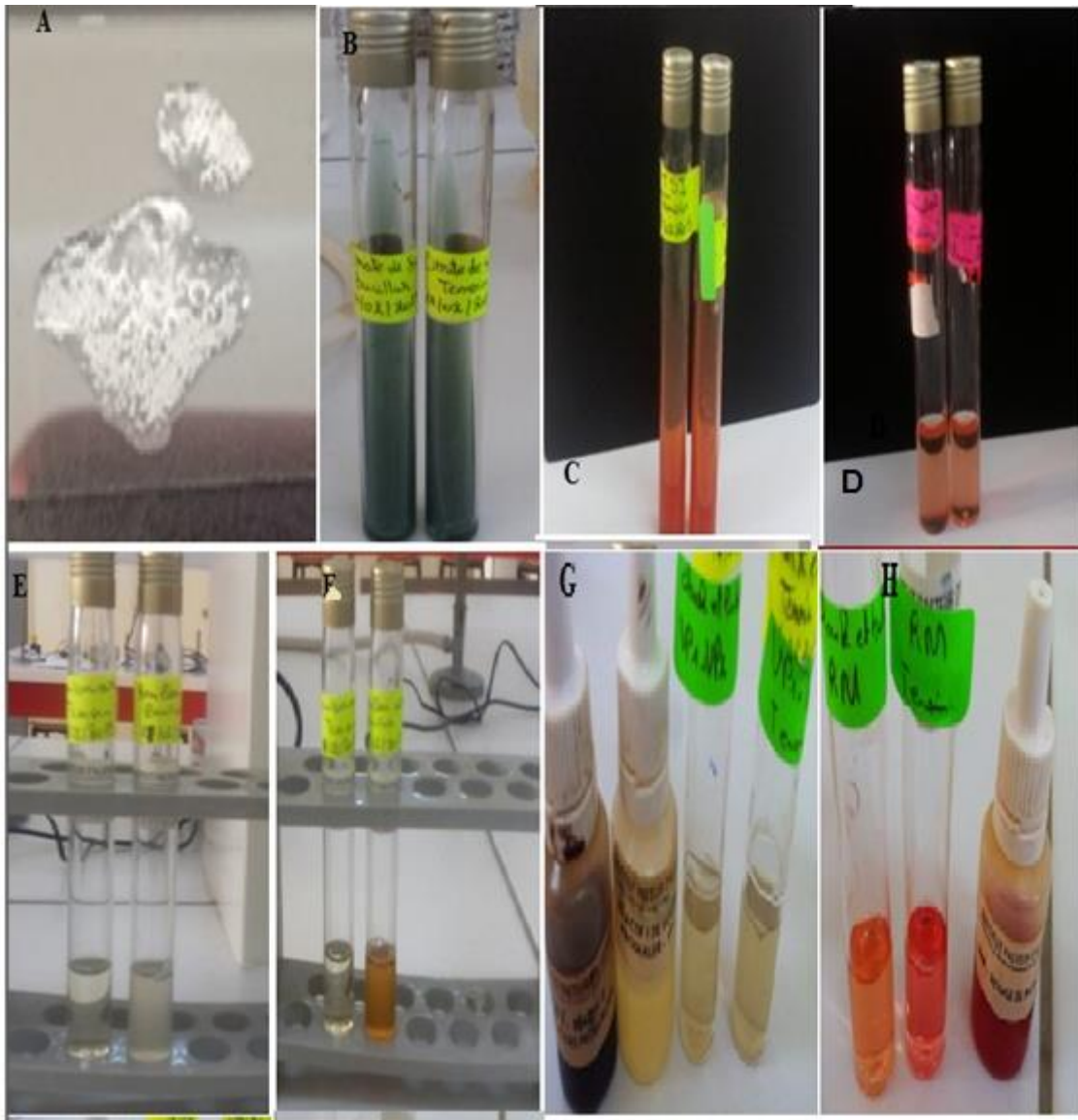


Fig. 9 : Résultats des tests biochimiques de la souche *Bacillus* sp.

A : Test de catalase positif ; B : Test de citrate positif ; C : Test de TSI négatif ; D : Test de l'uréase négatif ; E : test de nitrate réductase (avant les réactif) ; F : test positif de nitrate réductase (après les réactif) ; G : Test positif de VP ; H : Test positif de RM

3. Résultats des activités enzymatiques

Les résultats de la recherche des activités enzymatiques sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Activités enzymatiques des souches isolées.

Activités enzymatiques	La souche
Amylase	+
Protéase	+
Lécithinase	-
Gélatinase	+

- **Hydrolyse de l'amidon :** La souche est capable d'hydrolyser l'amidon, ce qui signifie que ces dernières possèdent une amylase. L'hydrolyse de l'amidon s'exprime par un halo d'éclaircissement autour des colonies (Fig.10, A). Selon **Bertoldo et Antranikian, (2001)** ; **Rao et Satyanarayana., (2007)**, de nombreuses espèces du genre *Bacillus* sont connues par leurs capacités à produire des α -amylases.

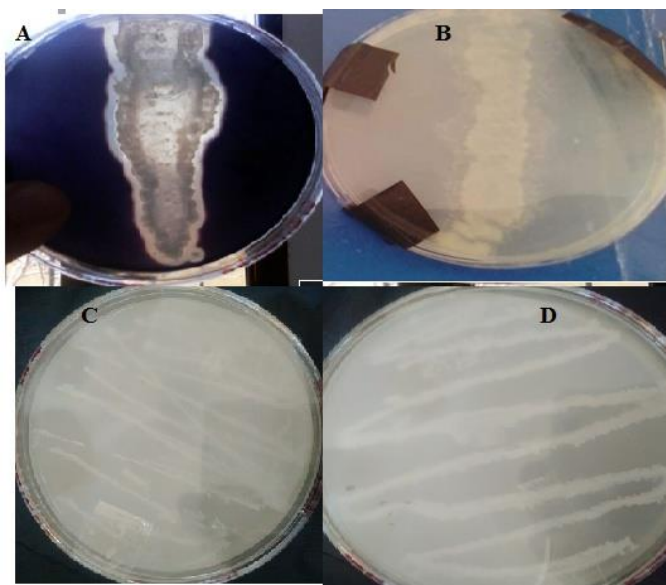


Fig. 10 : Résultats de l'activité enzymatique

A : test de l'amidon positif ; B : test de la gélatine positif ;
C : test de lécithine négatif ; D : test de la caséine positif.

- **Hydrolyse de la gélatine :** La souche de *Bacillus* sp possède la gélatinase, la zone claire correspondant autour des cultures reflète une bonne dégradation de la gélatine (fig.10, B). D'après **Burgess et al, (2010)** et **Poli et al., (2011)**, ses résultats sont conforme.

- **Hydrolyse de la lécithine :** L'absence d'une zone claire autour de la culture dans GN contenant l'émulsion du jaune d'œuf, témoigne que la souche ne possède pas de la lécithinase (fig. 10, C).
- **Hydrolyse de la caséine :** La souche possède la caséinase (fig.10, D), enzyme qui hydrolyse la caséine du lait. Cette protéase est mise en évidence par la formation d'un halo clair autour des colonies justifiant la dégradation de la caséine par souche *Bacillus* sp (Carole et Vignola, 2002).

4. Résultat de type respiratoire

Après l'incubation de la souche dans une température à 30 C⁰ nous avons remarqués une croissance normale. Le type respiratoire est aéro-anaérobie facultatif (fig. 11).

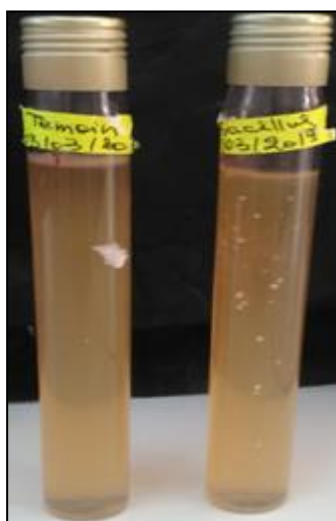


Fig. 11 : Résultat de type respiratoire en présence de *Bacillus* sp.

5. Production des extraits enzymatique de *Bacillus* sp

5.1. Dosage des extraits enzymatiques par la réaction de Biuret

Les extrait enzymatiques des amylases obtenus à partir d'isolat *Bacillus* sp ont été utilisés bruts, et dilués pour la quantification par la technique de Biuret. Le dosage de la protéine ovalbumine est réalisée grâce à la courbe d'étalonnage des dilutions de la protéine ovale albumine dans les mêmes conditions opératoires (pH= 5,2 et T= 40°C) (fig. 12).

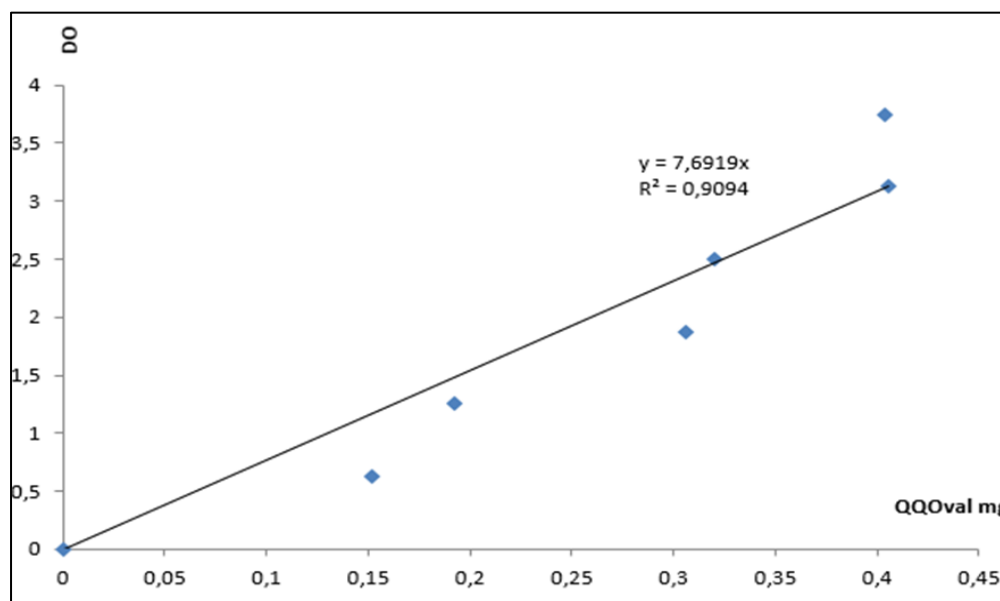


Fig. 12 : Courbe de la gamme d'étalonnage de la protéine ovalbumine.

La figure ci-dessus représente la gamme d'étalonnage d'ovale albumine et la concentration de l'extrait enzymatique de l'isolat *Bacillus* sp. Cette gamme est aligné avec un coefficient de régression $R^2 = 0,9094$ positif. Cette courbe a été utilisée pour évaluer la teneur de la protéine de l'extrait enzymatique de la souche *Bacillus* sp. Cette teneur est de 0,1.mg/ml. Selon, **Gigras, et al., (2003) et Pandey, (2000)**, les bacilles sont une source importante des protéines (enzymes amylases).

5.2. Cinétique des extraits d'amylasiques des isolats *Bacillus* sp

La gamme d'étalonnage du sucre réducteur glucose pur présente un coefficient de régression positif $R^2 = 0,78$ très proche de la valeur 1. Cela signifie que les différentes dilutions sont bien en linéarité. Cette courbe va servir à estimer les quantités du produit libérer, après l'hydrolyse du substrat l'amidon. Cette cinétique est estimée par la technique colorimétrique de la réduction du réactif liqueur de Fehling (fig.13). Le produit d'hydrolyse libéré par l'extrait enzymatique est un sucre réducteur (glucose), après l'hydrolyse du substrat l'amidon. Cette courbe a permet de quantifier ce produit libéré (fig. 13).

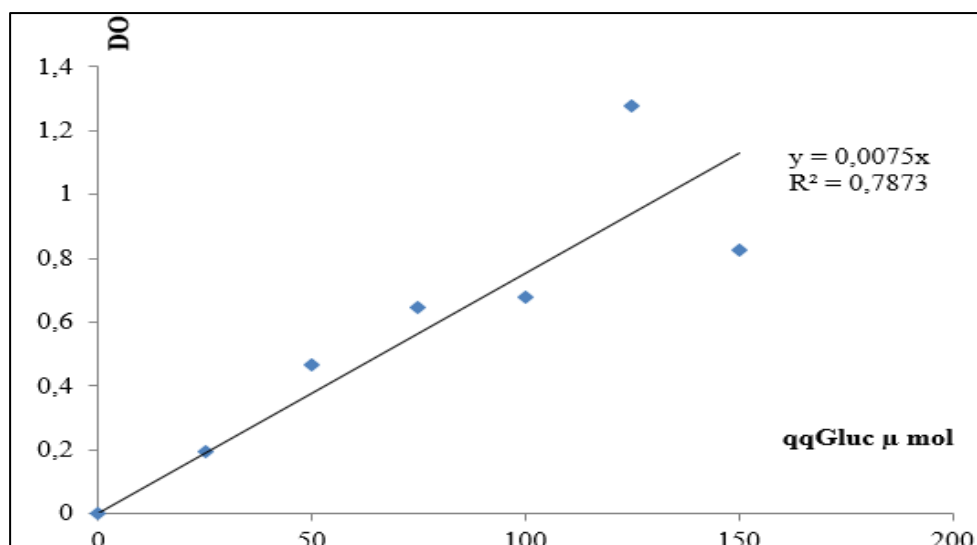


Fig.13 : Courbe de la gamme d'étalonnage du sucre réducteur pure le glucose.

5.3. Mesure des paramètres cinétiques

La cinétique enzymatique d'extrait d'amylase de la souche vis-à-vis l'amidon en fonction du temps permet de caractériser les constantes cinétiques (fig.14).

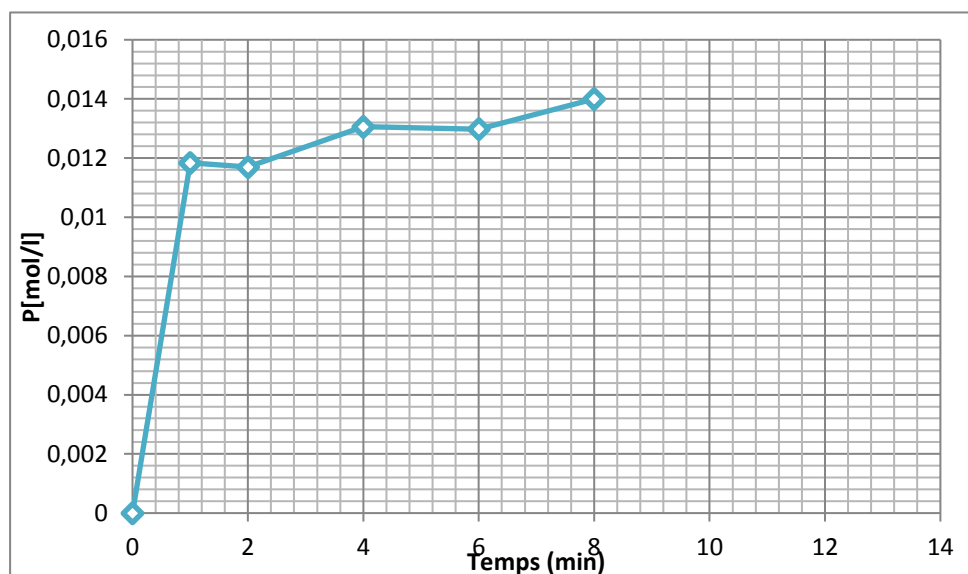


Fig. 14 : Cinétique enzymatique des extraits d'amylases vis-à-vis son substrat (amidon) en fonction du temps.

On constate d'après la figure ci-dessus, que l'extrait enzymatique hydrolyse le substrat d'amidon progressivement en fonction du temps. Grâce à cette courbe cinétique, la détermination des paramètres cinétiques, la vitesse des réactions et les concentrations du substrat hydrolyser pour tracer la courbe $V_i = f([S])$ et calculer les paramètres cinétiques (fig.15, tab.7). La variation de la concentration en substrat (amidon) au cours de la réaction et

dans des conditions optimales (pH et température) permet de déterminer les paramètres cinétiques K_m et V_{max} et V_i de l'amylase.

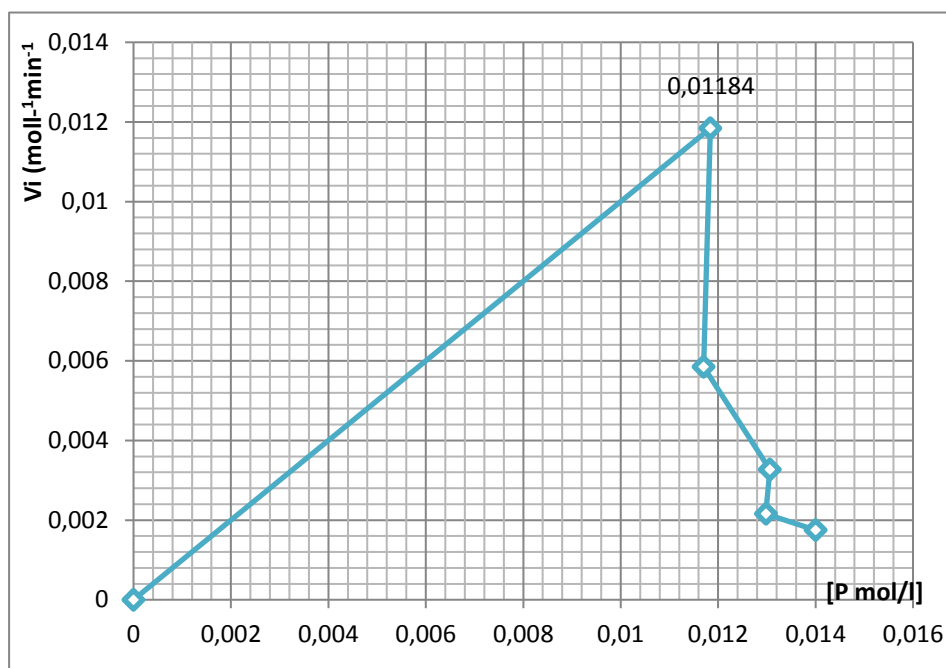


Fig. 15 : Les vitesses de la cinétique de l'extrait d'amylase vis-à-vis son substrat (amidon) en fonction du produit libéré.

Tableau 7 : Les paramètres cinétiques de l'extrait enzymatique de *Bacillus* sp.

La souche	K_m	V_{max} mol l ⁻¹ min ⁻¹	V_i mol l ⁻¹ min ⁻¹
<i>Bacillus</i> sp	6×10^{-3}	0,012	0,011

La valeur du K_m traduit l'affinité de l'enzyme avec le substrat (amidon), le k_m est de 6×10^{-3} présentes une bonne affinité avec le substrat amidon comparant avec la souche. Presque les mêmes résultats ont été réalisés sur les activités des amylases de *Streptomyces* sp et avec les mêmes techniques, où les K_m varient de $0,15 \times 10^{-3}$ à $8,08 \times 10^{-3}$; les V_{max} de $0,19 \times 10^{-3}$ $0,55 \times 10^{-3}$ et les V_i de 0,006 à 0,10 respectivement pour les souches (Souche 1, 2 et 3) (**Benzekhroufa, 2018**), confirment ses résultats.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspective

L'isolement et l'identification des *Bacillus* à partir des échantillons de sol de la région de Hassi mammech (wilaya de Mostaganem), a été réalisé afin de trier les isolats thermorésistants et producteurs des amylases sur un milieu sélectif riche en amidon. Ces isolats sont retenus et caractérisés sur la base des observations macroscopiques et microscopiques. La souche *Bacillus sp* est marquée par une croissance très rapide (24 à 48 heures). La forme des colonies est circulaire, de couleur beige translucide. L'examen microscopique révèle que les bactéries sont de Gram positif, elle présente des spores.

Les résultats des tests biochimiques obtenus sont positifs pour l'ensemble des réactions : hydrolyse de la gélatine, l'amidon, caséine, catalase, la réduction des nitrates et utilisation de citrate, VP et RM. Cependant, le test physiologique de type respiratoire de l'isolat *Bacillus sp* est aéro- anaérobie facultatif.

Les résultats de la cinétique enzymatique des extraits amyliques montrent une variation dans les activités amyliques. La souche de *Bacillus sp* présente une bonne affinité avec le substrat amidon, la valeur du K_m est de $0,006 \text{ mol l}^{-1}$ et la vitesse initiale enzymatique $V_i = 0,011 \text{ mol l}^{-1}\text{min}^{-1}$.

Les résultats obtenus ouvrent de nombreuses perspectives telles que :

- Poursuivre l'identification moléculaire d'isolats pour la confirmation de leur apparenté phylogénique.
- Étudier la production des enzymes amylases produites par d'autres méthodes d'extractions, de purifications et de caractériser par les techniques d'électrophorèses et HPLC, etc.
- Étudier les effets des paramètres physico-chimiques (Température salinité, pH) sur l'évolution cinétiques de l'amylase purifiée pour des utilisations industrielles.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Ait Abdelouahab N., (2008).** Livre de microbiologie alimentaire. Edition .1.04.4.302. ISBN 97899.6100.7547
2. **Ait kaki- El-Hadef El-Okki A., Leghlimi H., Dakhmouche S., Bennamoun L. et Meraihi Z., (2012).** Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α -amylase par *Rhizopusoryzae*. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Vol 6, (1), pp. 1-17.
3. **Alais C., Linden G., et Miclo L., (2008).** Biochimie alimentaire, DUNOD. 6ème édition, paris, pp.67-71.
4. **Alexandre Hervé., Granvalet Cosette., Guilloux-Benatier., Michèle Remize Barnavon Fabienne.,Tourdot-Marechal Raphaëlle.,(2008).**Les bactéries lactiques en œnologie. Edition Lavoisier p : 113.
5. **Allison S.D., Martiny J.B.H., (2008).** Colloquium Paper: Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. Proceedings of the National Academy of Sciences 105, 11512–11519.
6. **Anonyme.,(2012).**Fiche technique, Profil et horizons.
7. **Atlas R. M. &Bartha R., (1992).** Microbialecology. Fundamentals and applications. 3rd edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company. San Francisco, California (USA), 563.
8. **Badot R.M. et Merlin D., (1984).** Métabolisme énergétique et mouvement révolutif chez le haricot (*Phaseolusvulgaris*). Ann. Sci. Uni. Franche-Comté, Biol.Veg. (4), pp.7-12.
9. **Barnavon Fabienne.,Tourdot-Marechal Raphaëlle.,(2008).** Les bactéries lactiques en œnologie. Edition Lavoisier. p : 113
10. **Berry D. et Paterson A., (1990).** Enzymes in food industry. In:Sucking C.J. (ed.), Enzyme chemistry impact and application. Edition champman and hall London, 2nd edition, pp. 306 351
11. **Bertheau Y., Kotoujansky A. et Colenoa A., (1985).** Sources actuelles et potentielles d'enzymes d'hémolyses et de dépolymérisation. In : Mouranche A. et Coste C. (Ed) : Hydrolyses et dépolymérise enzymes, d'intérêt industriel. Ed. Gautier-Villard, pp.47-108.
12. **Bertoldo C., Grote R., & Antranikian G., (2001).** Biocatalys is under extreme conditions. Biotechnology Set, Second Edition, 61-103.
13. **Benzekhroufa Ahlem. (2018).** Contribution à l'étude cinétique des extraits enzymatiques de quelques de *Streptomyces* isolées du sol de la région de Mostaganem. Mémoire de master 1.Microbiologie appliquée.
14. **Boukrouh Noureddine. (2004).** Journal Officiel de la République Algérienne (Alger) N°70. p20

15. **Bousseboua H., (2002).** Eléments de Microbiologie Générale. Programmes de graduation. Editions de l'Université Mentouri. Constantine Algerie, pp.230-231.
16. **Burhan A., Unaldi N., Coral G., Colak O., AyganA.,GulnazO.,(2003).** Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic,alkaline and chelator resistant amylase from an *alkaliphilic Bacillus sp.* Isolate ANT-6. *Process Biochemistry.* (38): 1397-1403.
17. **Calvet R., (2003).**Le Sol, Propriétés et fonctions. Constitution et structure. Phénomènes aux Interfaces. Tome 1. Ed .France Agricole .Pp : 82-134.
18. **Calvet R., (2003).** Le Sol, Propriétés Et Fonctions, Tome 1, France Agricole DUNOD, Pp : 455.
19. **Camille D., (2007).**Microbiologie Pratique pour les laboratoires d'analyse ou de contrôle sanitaire.
20. **Camille delerras., (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire, recherche de bactéries*
21. **Carole Lapointe-Vignola., (2002).** Fondation de technologie laitière du Québec. Science et technologie du lait : transformation du lait. Edition : Presses inter Polytechnique. p : 1-3-4-21-26-29-51-89-90-539.
22. **Charles A., Guy L et Laurent M., (2003).** Biochimie alimentaire, 5ème édition de l'abrégé. Dunod, Paris.
23. **Chatterton J-R., VogelsongK-M., Lu Y- Ellman A-B et Hudgens G-A.,(1996).**Salivary-amylase as a measure of endogenousadrennergicactivity. *Clin. Physiol. J.* 16 (4), pp.344-348.
24. **Chiba S., (1988).** Amyl glycosidase. *In.* Handbook of Amylases and related enzymes (The Amylase Research Society of Japan), éd. Pergamum Press, Oxford, U.K, pp 104-116.
25. **Christieans Souad., Zagorec Monique., (2013).** Flores protectrices pour la CIRAD, Paris : p :444.
26. **Claus D and Berkeley R.C.W., (1986).** Genus *Bacillus Cohn.,(1872).* 174AL. In Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J.G. (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Baltimore, USA.
27. **Coucheney, E., Daniell T.J., Chenu C., Nunan N., (2008).** Gas chromatographic metabolic profiling: A sensitive tool for function al microbial ecology. *Journal of Microbiological Methods* 75, 491–500.
28. **Davet P., (1996) .** Vie microbienne du sol et production végétale. Ed. Institut National de la Recherche Agronomique .Paris. Pp : 21-87.
29. **DeAngelis, K.M., Lindow, S.E., Firestone, M.K., (2008).** Bacterial quorum sensing and nitrogen cycling in rhizospheresoil. *FEMS MicrobiologyEcology* 66, 197–207.
30. **Delarras C.,(2007).** Microbiologie Pratique Pour Le Laboratoire D'analyses Ou De Contrôle Sanitair, 1ère édition, Paris : Edition tec et doc, 476 p.

31. **De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B.,(2009).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition., Volume III, The Firmicutes. Springer, New York, USA.
32. **Delgado, S., Rachid, C. T., Fernández, E., Rychlik, T., Alegría, Á., Peixoto, R. S., & Mayo, B., (2013).** Diversity of thermophilic bacteria in raw, pasteurized and selectively-cultured milk, as assessed by culturing, PCR-DGGE and pyrosequencing. *Food microbiology*, 36(1), 103-111.
33. **Burgess, Sara A., Denise Lindsay, and Steve H. Flint.,(2010)** "Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing." *International journal of food microbiology* 144.2: 215-225.
34. **Denis F., Ploy M.C., Martin M., Bingen E., Quentin R., (2007).** *Bactériologie Médicale. Techniques usuelles.* Edn Elsevier Masson. P. 631.
35. **Dommergues Y., Mangenot F., (1970).** *Ecologie Microbienne Du Sol.* Paris, Massonet Cie.Pp23, 27,29.
36. **Duo-Chuan L., Yijun Y., You-liang P., Chong-yao S.,Peijin Z., Yicun H.,(1997).** Purification and properties of a thermostable alpha amylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* . *Acta Microbiol. Sin.* (37), pp.107-114.
37. **Fierer, N., Jackson, R.B., (2006).** The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 626–631.
38. **Fogarty W. M. et Kelly, C. T., (1994).** *Microbial Enzymes and Biotechnology .Applied Science, London, New York.* (43):71-132.
39. **Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A.C., Cacco, G., van Elsas, J.D., (1999).** Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 38, 1–15.
40. **Gobat .J.M, Aragno M et Matthey W., (2010).** *Le Livre (Le Sol Vivant : Base De Pédologie Et Biologie Des Sols).* 3eme Edition Revue Et Augmentée P150-165.
41. **Groffman, P.M., Hanson, G.C., Kiviat, E., Stevens, G., (1996).** Variation in microbial biomass and activity in four different wetland types. *Soil Science Society of America Journal* 60, 622–629.
42. **Gugliandolo C., Maugeri T., Caccamo D., and Stackebrandt E., (2003).** *Bacillus aeolius* sp. nov. a Novel Thermophilic, Halophilic Marine Bacillus Species from Eolian Islands (Italy). *System. Appl. Microbiol.* 26, 172-176.
43. **Gupta A., Gupta V-K., Modi D-R. et Yadava L-P., (2008).** Production and characterization of α - amylase from *Aspergillus niger*. *Biotechnologie* 7 (3), pp.551-556. Asian Network For Scientific Information. ISSN 1686-296X.

44. **Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K., Chouhan B et Process Biochem.** (2003). 38, 1599-1616.
45. **Jaune G., (2011),** Les Bactéries leur monde et nous vers une biologie intégrative et dynamique. Edition Dunod. Pp32.
46. **Jean-Michel Gobat., Michel Aragno., Willy Matthey., (2003) .** Le sol vivant (La base de pédologie des sols).Ed. Presses Polytechniques et universitaires Romandes. France PP : 5 -131.
47. **JocteurMonrozier, L., Guez, P., Chalamet, A., Bardin, R., Martins, J., Gaudet, J.P., (1993).** Distribution of microorganisms and fate of xenobiotic molecules in unsaturated soil environments. Science of the total environment 136, 121–133.
48. **Larpent J.P., Larpent-Gourgaud M.,(1985).** Manuel pratique de microbiologie. Ed. Hartmann, France. 230p.
49. **Larpent-gourgaud M. et Sanglier J.J., (1992).** Biotechnologies, principes et méthodes. Ed Doin., pp 574-581.
50. **Lateef A., Oloke J-K., Gueguim-Kana E-B. et Adebayo I., (2004).** Aspects of the isolation and characterizaton of thermostable α -amylase from *Alternaria alternata*. Global Journal of Pure and Applied Sciences Vol 10, N°1, pp. 75-79.
51. **Lauber C.L., Strickland M.S., Bradford M.A., Fierer N., (2008).** The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. SoilBiology and Biochemistry 40, 2407–2415.
52. **Lejon D., Sebastia J., Lamy I., Chaussod R., Ranjard L., (2007).** Relationships between Soil Organic Status and Microbial Community Density and Genetic Structure in Two Agricultural Soils Submitted to Various Types of Organic Management. Microbial Ecology 53, 650–663.
53. **Leveau J.Y. et Bouix M., (1993).** Les moisissures. In : Florent J. Ed. Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Edition Tec et Doc .Lavoisier .Apria, pp.110-170.
54. **Liese A., Seelbach S., Wandrey C. et Wileyu VCH., (2000).**Industrial biotransformations.
55. **Lucio de-Sousa E., Erika M-E-H., Castilho V-M., Dclima A., Bellini M-Z. et Cruz Z-R., (1996).** Production and characterization of α -amylase from *Rhizopus* sp. Art.Biol. Technol., 39 (4), pp.813-839
56. **Madigan M.T. and Martino J.M., (2006).** Brock Biology of Microorganisms, 11 ed.; Pearson Education. Upper Saddle River, NJ, USA
57. **Maria P., MacWilliams., (2009).** Citrate Test Protocol-Microbe Library.
58. **Marschner, P., Kandeler, E., Marschner, B., (2003).** Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilize rexpériment. Soil Biology and Biochemistry 35, 453–461.

59. **Mayer Alphonson, Bernard Alin José Diena; (2004).** cours de microbiologie générale et exercice corrigé.
60. **Mazur A. K. et Nakatani H., (1993).** Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic amylase hydrolysis of amylose and amylopectine. Arch. Bioch. Biophys. Vol., 306 (1), pp. 29-38.
61. **Mc Tighe, Kelly C.T., Doyle E.M. et Fogarty W.M., (1995).** The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus* sp. IMD 370. Enzyme and Microbial Technology. (17), pp 570-573.
62. **Mercier C., (1985).** Les enzymes amylolytiques. In : Mouranche A. Coste C. hydrolases et dépolymérasés. Ed Gauthier-Villars., pp.110-140.
63. **Milner J.A., Martin D.J. et Smith A., (1997).** Two-stage inoculate for the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. Enzyme and microbial technology. (21), pp.382-386.
64. **Monica C., (2006).** District Laboratory Practice in Tropical Countries. 2 part. Cambridge University Press. p : 65.
65. **Morel R ., (1989) .** Les sols cultivés. Lavoisier. Tec et Doc. Paris .p123
66. **Morvan J., (2010).** Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires.M55B. <http://www.frost.com>.
67. **Moyano, F.E., Manzoni, S., Chenu, C., (2013).** Responses of soil heterotrophic respiration to moisture availability: An exploration of processes and models. Soil Biology and Biochemistry 59, 72–85.
68. **Nielson J-E., Borchert T-V et Vriend G., (2001).** The determinant of α -amylase pH-activity profiles Protein Engineering. Oxford University Press. 14 (7), pp.505-512
69. **Nigam P. et Singh D., (1995).** Enzymes and microbial systems involved in starch processing. Enzyme Microb. Technol. 17 (9), pp.770-778
70. **Nouadri T., (2011).** L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification, Caractérisation et immobilisation. Thèse de Doctorat d'Etat ; Option Biochimie Biotechnologies. Université Mentouri-Constantine, 125p
71. **Oren A., (2002).** Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology and application. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology ; 28:56-63..0
72. **Pandey A., Nigam P., Soccol C.R., Soccol V. T., Singh D. et Mohan R., (2000).** Advances In. Microbial amylases. Biotechnology. Appl. Biochem. (31), pp.135-152.
73. **Pansu M et Gautheyrou J., (2001).** L'analyse Du Sol Minéralogique, Organique Et Minérale. Edition Springer.

- 74. Park C.S., Chang C.C., Kim J.Y., Ogrydziak D.M., Ryui D.D.Y., (1997).** Expression, secretion, and processing of rice Alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.*, 272 (11), pp.6876-6881
- 75. Patricia Touyre., (2015).** *Le Sol un monde vivant*. Pp81, 85.
- 76. Peixoto-nogueira S.C., Sandrim V.C., Guimarães L.H.S., Jorge J.A., Terenzi H.F. et Polizeli M.L.T.M., (2008).** Evidence of thermostable amylolytic activity from *Rhizopus microsporus* and *Rhizopodi formis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source, *Bioprocess and Biosystem Engineering*, (31), pp.329-334.
- 77. Perry J.J., Staley J.T., et Lory S., (2004).** Cours et questions de révisions. PCEM.PCEP.1er cycle/licence 2eme cycle/master. Dunod. Ed. Paris. pp :480-481.
- 78. Pieri C., (1989).** Fertilité des terres de savanes. Bilan de trente années de recherches et de développement agricole au sud du Sahara. Ministère de la Coopération et du Développement, CIRAD, Paris : 444 p.
- 79. Priestle Y-P., (1988)** -A sterea cartoon-drawing program for proteins. *J.Appl. Crystall.*, 21 :472-576.
- 80. Quénéa K., (2004).** Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'un chrono séquence forêt/maïs (CESTAS, Sud ouest de la France). Thèse de Doctorat. Université de Paris 6 (France).
- 81. Raimbault M., (1981).** Fermentation en milieu solide : Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. Travaux et documents de L'O.R.ST.O.M, N°127, 273p.
- 82. Ranjard L., Richaume, A., (2001).** Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology* 152, 707–716.
- 83. Rao JL Uma Maheswar, and Satyanarayana T., (2007).** "Improving production of hyper thermostable and high maltose-forming α -amylase by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology and its applications." *Bioresource Technology* 98.2): 345-352.
- 84. Rajagopalan G., Krishnan C. (2008).** Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *BioresourTechnol.* ; 99:3044–3050.
- 85. Ripert Christian. (2013).** *Mycologie médicale*. Edition Lavoisier. p : 327.
- 86. Roger P. et J. L. Garcia., (2001).** *Introduction à la microbiologie du sol*. Acad. Press Inc. 15
- 87. Rothschild L.J., Mancinelli, R.L., (2001).** Life in extreme environments. *Nature* 409, 1092–1101.

- 88. Savcheko A., Vieille C., Kang S. et Zeikus J-C., (2002).** Pyrococcus -amylase is stabilised by calcium and zinc .Department of biochemistry and molecular biology. University of Lausane, pp.111-123.
- 89. Schimel J., Balsler T.C., Wallenstein M., (2007).** Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* 88, 1386–1394.
- 90. Schimel J.P., Gullledge J., (1998).** Microbial community structure and global trace gases. *Global Change Biology* 4, 745–758.
- 91. Scriban R., (1999).** Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris, pp.149-159.
- 92.** *Soil. Applied Environmental Microbiology.* 68, 326–334.
- 93. Soltner D., (2004).** Distribution Liquide Et Voie Métabolique Chez Quatre Bactéries Gram négative Hydrocarbonoclaste. Variation En Fonction De Sources De Carbone. Docteur De L'université PARIS 6.
- 94. Sposito, G., (2008).** The Chemistry of Soils. Oxford University Press, New York.
- 95. Srinivasa Rao M., Reddy G., Venkateswara Rao G and Sambasiva Rao K. R.S., (2004).** Studies on the extraction and characterisation of thermostable -amylase from pericarp of *Borassus indica*. *African Journal of Biotechnology.* (4), pp.289-291
- 96. Standing D., Killham K., (2007).** The soil environment, in: *Modern Soil Microbiology.* Van Elsas, J.D., Jansson J.K., Trevors J.T., New York, CRC Press, pp. 1–22.
- 97. Subhash Chandra Parija., (2009).** Textbook of Microbiology and Immunology.
- 98. Talamond P., Desseaux V., Moreau Y., Santimone M. et Marseillemouren G., (2002).** Isolation, characterization and inhibition by acarbose of the alpha-amylase from *Lactobacillus* fermentation: comparison with *Lb. Manihotivorans* and *Lb. Plantarum* amylases. *Comp Biochem. Physiology. Biochem. Mol Biol.*, 133 (3), pp.351-60.
- 99. Vertiani C., Maeder D-I., Yip K-S, Stilman T-J., Britten K-L., Rice D-H, Klump H. et Robb F-T., (1998).** Protein thermostability above 100 °C a key role for ionic interaction. *Proc. Nat. Sci. USA*, 95, pp.12300-12305.
- 100. Washington Winn Jr., Stephen Allen., William Janda., Elmer Koneman., Gary Xavier et Laurence., (1997).** Bactéries, virus et champignons. Edition Flammarion. Pp17.
- 101. Zhou J., Xia B., Treves D.S., Wu L.-Y., Marsh T.L., O'Neill R.V., Palumbo A.V., Denis F., Ploy M.C., Martin M., Bingen E., Quentin R., (2007).** Bactériologie Médicale.

Annexe

I. Composition des milieux de cultures et des solutions**1. Les milieux de culture :****Gélose nutritive**

- Amidon.....10g
- Peptone.....5g
- Extrait de viande.....1g
- Extrait de levure.....2g
- NaCl.....5g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1L
- PH=7.5

Citrate de Simmons

- Citrate de sodium.....1g
- Bleu de bromothymol.....0,08g
- Chlorure de sodium.....5g
- Sulfate de magnésium.....0,2g
- Hydrogénophosphate de potassium.....1g
- Dihydrogénophosphate d'ammonium.....1g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1L
- PH=7,1

Gélose TSI

- Peptone.....15g
- Extrait de viande.....3g
- Extrait de levure.....3g
- Peptone pepsique de viande.....5g
- Glucose.....1g
- Lactose.....10g
- Saccharose.....10g

- Rouge de phénol.....0,05g
- Chlorure de sodium.....5g
- Thiosulfate de sodium.....0,3g
- Agar.....18g
- Eau distillée.....1L
- PH=7,5

Urée indole

- Urée.....2g
- L-tryptophane.....0.3g
- Ethanol à 0,95.....1cm³
- Rouge de phénol.....2,5mg
- Chlorure de sodium.....0,5g
- Dihydrogénophosphate de potassium.....0,1g
- Hydrogénophosphate de potassium.....0,1g
- Eau distillée.....1L
- PH=7

Bouillon Clark et Lubs

- Peptone.....5g
- Glucose.....5g
- Hydrogénophosphate de potassium.....5g
- Eau distillée.....1L
- PH=7,5

Milieu d'extraction

- Amidon.....10g
- Na₂HPO₄.....10g
- Extrait de levure.....5g
- KCl.....0,5g
- MgSO₄.....0,015g
- Eau distillée.....1L
- PH=7

Gélose a lécithine

Gélose de 250 ml, additionné de jaune d'œuf dilué dans 100 ml d'eau distillé stérile

Gélose au lait

GN250 ml

Lait écrémé.....2, 5 ml

2. Les solutions**2.1. Tampon acétate de Sodium à 0,05M**

- 4,1g d'acétate de Na.
- 100 ml d'eau distillé.
- Ajuster le pH à 4,7 ou 4,6 avec l'acide acétique dilué.

2.2. Préparation de la liqueur de Fehling

- **Solution cuprique A** : Sulfate de cuivre pur : 40 g ; Acide sulfurique : 2 ml ;
Eau : 1L
- **Solution Tartarat-Alcaline B** : Tartrate double de sodium et de potassium : 200 ;
Soude : 150 g ; Eau : 1L

2.3. Préparation de biuret

- Sulfate de cuivre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,5g
- Tartaratedoule de potassium et de sodium.....6g
- NaOH30g
- Iode de potassium1g
- H_2O :1L

Résumé : Le présent travail porte sur l'isolement du genre *Bacillus* à partir du sol. L'objectif principal est d'identifier des bacilles thermophiles aéro-anaérobie facultatifs plus performants pour la production d'alpha amylases. Les résultats de la caractérisation morphologique révèlent que des colonies sont circulaires de couleur beige, à Gram positif et cellules sporulés. Cependant, l'ensemble des tests biochimiques et physiologiques sont positifs, le type respiratoire de l'isolat est aéro-anaérobie facultatif. Cela confirme l'identification de la souche de genre *Bacillus sp*. L'inoculum de la souche a été employé dans un milieu liquide pour la production d'alpha-amylases. Le dosage protéique de l'extrait enzymatique a été quantifié par la méthode de Biuret. L'utilisation de l'extrait enzymatique dans un milieu réactionnel à base de l'amidon permet de déterminer les paramètres cinétiques Km, Vmax et Vi de l'extrait. Cette cinétique à été suivi par le dosage du produit libéré en fonction du temps, la cinétique enzymatique est estimée par la méthode colorimétrique au réactif liqueur de Fehling. La souche de *Bacillus sp* présente une bonne affinité avec le substrat amidon, la valeur du Km est de 0,006 mol l⁻¹ et la vitesse initiale enzymatique Vi = 0,011 mol l⁻¹min⁻¹. Les résultats obtenus nécessitent d'autres méthodes d'études pour identification.

Mots clés : *Bacillus sp*, thermophiles facultatifs, Alpha amylase, Km et Vmax et Vi.

المخلص:

يركز هذا العمل على عزل جنس البكتيريا العسوية المعزولة من التربة. الهدف الرئيسي هو تحديد فعالية البكتيريا العسوية ذات النمط التنفسي الاختياري لإنتاج الألفا أميلاز. كشفت نتائج الوصف المورفولوجي أن المستعمرات عبارة عن خلايا دائرية بلون أبيض رمادي، إيجابية الجرام وخلايا ذات أبواغ. ومع ذلك، فإن جميع الاختبارات البيوكيميائية والفسولوجية إيجابية، نمطها التنفسي هو هوائية-لاهوائية اختيارية. هذا يؤكد التعرف على سلالة جنس *Bacillus sp*. تم استخدام مستخلص السلالة في وسط سائل لإنتاج ألفا الأميلاز. تم تقدير كمية البروتين في مستخلص الإنزيم بواسطة طريقة بيوري. كما استخدم هذا المستخلص في وسط تفاعل يعتمد على النشاء لتحديد القيم الحركية km، Vmax و Vi للمستخلص. بعد ذلك هذه حددت الحركية عن طريق فحص المنتج الذي تم إصداره كدالة للوقت، يتم تقدير الحركية الأنزيمية بواسطة الطريقة اللونية مع كاشف فهلينج السائل. تمتلك سلالة *Bacillus sp* تكاملاً و تقارباً جيداً مع الركيزة النشاء، وقيمة Km هي 0.006 مول l⁻¹ والسرعة الأنزيمية الأولية تساوي 0.011 مول l⁻¹ الدقيقة⁻¹. النتائج التي تم الحصول عليها تتطلب طرق أخرى للدراسة لتحديد الهوية.

الكلمات المفتاحية: *Bacillus sp*، مقاومة للحرارة وذات نمط تنفسي اختياري، ألفا أميلاز، ثابت ميخائيليس، السرعة الحدية، و السرعة الابتدائية.

Abstract:

This work focuses on the isolation of the genus *Bacillus* from the soil. The main objective is to identify more efficient aéro-anaerobic thermophilic bacilli for the production of alpha amylases. The results of the morphological characterization reveal that colonies are circular beige, Gram-positive and sporulated cells. However, all the biochemical and physiological tests are positive; the respiratory type of the isolate is optional aéro-anaerobic. This confirms the identification of the strain of genus *Bacillus sp*. The inoculum of the strain was used in a liquid medium for the production of alpha-amylases. The protein assay of the enzyme extract was quantified by the Biuret method. The use of the enzyme extract in a reaction medium based on starch makes it possible to determine the kinetic parameters Km, Vmax and Vi of the extract. This kinetics was followed by the assay of the released product as a function of time; the enzymatic kinetics is estimated by the colorimetric method with the Fehling liquor reagent. The *Bacillus sp* strain has a good affinity with the starch substrate, the Km value is 0.006 mol l⁻¹ and the initial enzymatic velocity Vi = 0.011 mol l⁻¹ min⁻¹. The results obtained require other methods of study for identification.

Key words: *Bacillus sp*, optimal thermophilic, alpha amylase, Km and Vmax and Vi.

