REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme du master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologique

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Détermination de la production des enzymes hydrolytiques des Bacillus isolées de la rhizosphère de l'orge

Présenté par :

ARAB GHADA

BERREKIA HIBA

Soutenu publiquement le 23 Juin 2022 Devant le jury compose de :

Présidente	CHAOUATI.K	MAA	Université de Médéa
Examinatrice	BOUMEDIENNE.F	MAA	Université de Médéa
Encadrante	BOUHERAMA. A	MAA	Université de Médéa

Année Universitaire : 2021/2022

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES



Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme du master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologique

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Détermination de la production des enzymes hydrolytiques des Bacillus isolées de la rhizosphère de l'orge

Présenté par :

ARAB GHADA

BERREKIA HIBA

Soutenu publiquement le 23 Juin 2022 Devant le jury compose de :

Présidente	CHAOUATI.K	MAA	Université de Médéa
Examinatrice	BOUMEDIENNE.F	MAA	Université de Médéa
Encadrante	BOUHERAMA. A	MAA	Université de Médéa

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciements et Dédicaces

Remerciements

Avant tout nous remercions ALLAH, le tout puissant qui nous a donné, la patience et la santé durant toutes les années de nos études et surtout en accomplissant ce modeste travail.

Nous voulons tout d'abord exprimer chaleureusement notre profonde gratitude à notre promotrice ***Mme BOUHERAMA Amina****, pour la confiance qu'elle nous a accordé, et de son soutien scientifique et moral tout au long du travail, et surtout pour la grande motivation qu'elle a sue nous insuffler durant notre parcours.*

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury Mme ***CHAOUATI KARIMA*** *et Mme* ***BOUMADIENNE Farida****. Pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.*

Nos vifs remerciements vont, également à tout le personnel de laboratoire Microbiologie précisément ***Mme TIFFOURA, Mme fatima , Mme faisa*** *pour leurs aides et surtout pour leurs gentillesses.*

Notre profonde gratitude va également à tous les enseignants et les Enseignantes de département de la nature et de la vie qui ont participé Le long de ces 5 années à notre formation et pour leurs très grands dévouements.

Et bien sûr sans oublier de remercie tous les étudiants de la promotion Master 2 Microbiologie Appliquée 2021/2022.

Finalement un tel travail ne peut être réalisé sans le soutien de tous les jours par des gens qui ne comprennent pas nécessairement ce que tu fais, mais qui sont là lorsque tu en as besoin. Un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à accomplir ce modeste travail

Dédicaces

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers, À ma chère maman aucune dédicace ne serait exprimée mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien-être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance. J'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Le Puissant Dieu, le très haut, vous accorde santé, bonheur et longue vie. Je t'aime de tout mon cœur.

A celui qui s'est changé la nuit en jour pour m'assurer les bonnes conditions, à celui dont le nom est inséparable du mien mon cher ***papa*** *pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour, pour son amour, Et ses encouragements. Que ce travail, soit pour vous. Qu'ALLAH le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur et te protège de tout mal.*

A ma fleur d'oranger m'unique sœur ma petite princesse tu m'as laissé de belles choses qui ne finissent jamais.

A mon âme qui se tenait debout même quand elle était épuisée, à ma seul inspiration ma voix et le son de ma guitare.

A ma belle promotrice madame ***BOUHERAMA*** *pour son précieux conseil et son aide durant toute la période du travail, pour ses orientations, sa patience et sa disponibilité.*

A mes copines manel , hakima , radia , sabrina , nawel , zola que Dieu vous protège et vous procure joie et bonheur et que notre amitié reste à jamais mes très chère

A mon cher ami abdelhake et tous mes collègues de la promotion Microbiologie appliquée 2021/2022

À mon cher binôme hiba BERREKIA
Je le dédie à tous ceux que j'aime comme une petite preuve d'amour et de reconnaissance.

Ghada

Dédicace

Mes très chers parents.

En témoignage de mon profond amour et mon plus grand respect. Je ne vous remercierai jamais assez pour la confiance que vous m'avez accordée, pour votre soutien tout au long de ma scolarité, pour tous vos sacrifices depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

À mes chéres sœurs hind,lamia et mon frére mohamed qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études .

À mon soutien moral et ma chère tante rym et tonton Souhil.

A mes chers Grands-Parents Mohamed,Fadhila,Assia.

À mes tantes « Sarah, Anissa, Selma, Mio, Dalila, Soumia, Hadjer, Lila, Hadjer, Asmaa »et mes oncles « Amine,Mohamed » notamment Redhouane et Mustapha.

À tous mes cousins et cousines spécialement mes deux princesses Hadia et safaa.

Aux âmes de mon grand- père Djelloul et ma tante Naima que dieu leurs accorde sa miséricorde.

À mon cher binôme Ghada Arab.

À ma chére promotrice Bouherama Amina pour sa coopération, qui m'a toujours apporté durant cette période de travail un appui morale et n'a pas lesiné ni de son temps ni de son information.

À mes chères meilleures amies : Safaa benterkia, Imene boumenir.

Hiba

Résumés

Résumé :

Dans le cadre d'une étude qui porte sur la détermination de la production des enzymes hydrolytiques chez les bactéries du genre Bacillus et qui ont été isolées à partir du sol rhizosphérique de l'orge cultivé dans une zone aride d'Algérie (El Meneaa).

Les 53 isolats retenus pour cette étude ont montré une capacité de production des dix enzymes testés : lipase, protéase, amylase, phosphatase, cellulase, uréase, pectinase, lécithinase. La majeure partie de nos isolats (70%) ont montré une forte production d'amylase, protéase, lécithinase et phosphatase.

7 isolats considérés comme les meilleurs producteurs de l'alpha Amylase ont été testé pour leur activité amylolytique qualitative et quantitative. 3 isolats parmi les sept ont montré une production de glucose de 2.5 et 3 $mg.ml^{-1}$ respectivement. Cette production varie en fonction de la température, le pH et la salinité.

Mots- clés : Enzyme, Acitivité enzymatique, Bacillus,Amylase, Biotechnologie.

Abstract:

In the framework of a study on the determination of the production of hydrolytic enzymes in bacteria of the genus Bacillus, which were isolated from the rhizospheric soil of barley cultivated in an arid zone of Algeria (El Meneaa).

The 53 isolates selected for this study showed a production capacity of the ten enzymes tested: lipase, protease, amylase, phosphatase, cellulase, urease, pectinase, lecithinase. The majority of our isolates (70%) showed high production of amylase, protease, lecithinase and phosphatase.

7 isolates considered as the best producers of alpha Amylase were tested for their qualitative and quantitative amylolytic activity. Three of the seven isolates showed a glucose production of 2.5 and 3 mg.ml-1 respectively. This production varied with temperature, pH and salinity.

Keywords: Enzyme, Enzymatic activity, Bacillus, Amylase, Biotechnology.

Liste des abréviations

ADN : L'acide désoxyribonucléique.

AIA : Acide Indole Acétique

AL^{+2} : Aluminium.

ARN : l'acide ribonucléique.

BRO : Bacillus Rhizosphère Orge.

C : Carbone.

C ° : Degrés Celsius.

Ca^{+2} : Calcium

CAS : Chrome Azurol Sulfate.

CMC : Carboxy-Methyl-Cellulose.

CO(NH2)2 : Urée.

Co_2 : Dioxyde de cabone.

DHA : Acide docosahexaénoïque.

DO : Densité Optique.

Fe+3 : Oxyde de fer.

G: Gramme.

G+ C% : Guanine et cytosine.

H : Hydrogène.

H_2O_2 : Eau oxygénée.

HCN : Acide cyanhydrique.

I2 : Diiode.

IC : Indice cellulosique.

ISP : L'indice de solubilisation.

ISR : L'induction de la résistance systémique.

K : Potassium.

KSB : bactéries solubilisatrices des potassiums.

L : Litre.

LPS : Lipopolysaccharides.

M : Mole.

Mg : Milligramme.

Min : Minute.

Ml : Millilitre.

Mm : Milimétre.

N2 : Diazote.

Nacl : Chlorure de sodium.

NaOh : Hydroxyde de sodium.

NH3 : Ammoniac.

NH4+ : Ammonium.

Nm: Nanométre.

NO2- : Dioxyde d'azote.

NO3- : Nitrate.

OH : Hydroxyle.

P : Phosphore.

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

Ph : Potentiel Hydrogène.

PPM : Parties par million.

PSB : Bactéries solubilisant le phosphate.

RPM : Revolution per minute.

SI : Silicium.

TSA : Trypticase soy agar.

TSB : Trypticase soy bouillon.

µm : Micromètre

Liste des tableaux et Figures

Figures :

Figure 1: *Modes d'action des bactéries promotrices de croissance des plantes (Garcia et al.,2015).* _____ *5*

Figure 2: *Étapes de conversion de l'azote atmosphérique en ammoniac par la nitrogénase (Mouna, 2007).* _____ *7*

Figure 3: *Représentation schématique des mécanismes de solubilisation/minéralisation et immobilisation du phosphate dans le sol par les PSB (Sharma et al.,2013)* _____ *8*

Figure 4: *Les différents mécanismes de solubilisation de potassium (Etesami et Adl, 2020).* _____ *9*

Figure 5: *Représentations schématiques du rôle du PGPR producteur de sidérophore (Sid) dans l'amélioration de la disponibilité du fer pour la plante (Etesami et Adl, 2020).* ____ *10*

Figure 6: *Reconstruction phylogénétique des Bacillus basée sur l'ARN 16S (Maughan et Van des Auwer, 2011).* _____ *17*

Figure 7:*Observation au microscope électronique de cellules végétatives de Bacillus cereus(a) (Lund et Granum, 1996), des spores de Bacillus polyfermenticus(b) (Kim et al., 2009) et de la ciliature péritriche de Bacillus subtilis(c) (Luis et al., 2009).* _____ *17*

Figure 8: *Distribution des enzymes hydrolytiques pour diverses applications biotechnologiques.* _____ *20*

Figure 9: *Les enzymes hydroluptiques et leur application biotechnologique dans l'alimentation et les secteurs connexes* _____ *25*

Figure 10: *Localisation géographique de la wilaya d'El Menia (a) et vue satellitaire de la station de recherche expérimentale de l'université des sciences et de la technologie – USTHB-(b) et les zones de prélèvement du sol au niveau de la station (c).* _____ *28*

Figure 11: *Résultats des tests de sélection des isolats comme étant appartenant au genre Bacillus.* _____ *29*

Figure 12:*Mise en évidence la production des lipases sur gélose au tween 80.* _____ *42*

Figure 113: *Diamètre de l'halo de la zone claire autour des colonies productrices d'urée.* _____ *43*

Figure 14: *Mise en évidence de la production des protéases sur gélose au lait écrémé* __ *44*

Figure 15: *Diamètre de l'halo de la zone claire autour des colonies productrices de protéase.* _____ *45*

Figure 16:*Mise en évidence de la production des cellulases sur milieu carder additionner de CMC.* _____ *46*

Figure 17: *Diamètre de l'halo de la zone claire autour des colonies productrice de cellulase.* _____ *47*
Figure 18: *Mise en évidence de la production de l'uréase sur milieu à base de peptone.* *48*
Figure 19: *Diamètre de l'halo de la zone claire autour des colonies productrice d'uréase.* _____ *49*
Figure 20: *Aspect du milieu à base de gélatine après ensemencement par nos isolats.* __ *50*
Figure 21: *Mise en évidence de la production de phosphatase sur milieu NBRIP.* _____ *51*
Figure 22: *Diamètre de l'halo de la zone claire autour des colonies productrice de phsphatase.* _____ *51*
Figure 23: *Aspect du milieu de culture après ensemencement par nos isolats* _____ *52*
Figure 24: *Mise en évidence de la production de phosphatase sur milieu à base de pectine.* _____ *53*
Figure 25: *Diamètre de l'halo de la zone claire autour des colonies productrice de pectinase.* _____ *54*
Figure 26: *Mise en évidence de la production de lécithinase sur milieu à base de de jaune d'œuf.* _____ *55*
Figure 27: *Diamètre de l'halo de la zone claire autour des colonies productrice de lécithinase.* _____ *55*
Figure 28: *Mise en évidence de la production de lipoprotéinase sur milieu à base de jaune d'œuf.* _____ *56*
Figure 30: *Colonie productrice d'amylase (A) et non productrice d'amylase (B).*_____ *57*
Figure 31: *Mise en évidence de la production de l'amylase sur milieu à base d'amidon.* *58*
Figure 32: *Diamètre de l'halo de la zone claire autour des colonies productrice d'amylase.*_____ *58*
Figure 33: *Courbe d'étalonnage de glucose (g.l^{-1}).* _____ *69*
Figure 34: *Aspects morphologique des colonies des Bacillus.*_____ *71*
Figure 35: *Observation des cellules au microscope photonique (x100) après coloration de Gram.* _____ *72*
Figure 36: *Mise en évidence de la réaction gazeuse catalysée par l'enzyme Catalase.* __ *73*
Figure 37: *Mise en évidence de l'enzyme cytochrome oxydase.Mise en évidence de l'enzyme cytochrome oxydase.* _____ *74*
Figure 38: *Test positif de mannitol et mobilité pour les dix isolats.* _____ *74*
Figure 39: *Tolérance des isolats de Bacillus spp. testés à différentes valeurs de pH.* ___ *75*
Figure 40:*Tolérance des isolats de Bacillus spp. testés à différentes températures.* ____ *76*

Figure 41: *Tolérance des isolats de Bacillus spp. testés à différentes valeurs de salinité.77*
Figure 42: *Mise en évidence des bacillus spp fixatrice d'azote. _____ 78*
Figure 43: *Production de sidérophore par B.subtilis subspp._____ 79*
Figure 44:*Mise en évidence de la formation de biofilm par les isolats. _____ 80*

Tableaux :

Tableau 1: *Taxonomie du genre Bacillus (Priest et al., 1993)_____ 15*
Tableau 2 : *Influence de la température sur l'activité amylolytique des sept isolats.____ 60*
Tableau 3: *Influence de pH sur l'activité amylolytique des sept isolats. _____ 63*
Tableau 4: *Influence de pH sur l'activité amylolytique des sept isolats. _____ 66*
Tableau 5: *Influence de la quantité d'amidon sur l'activité amylolytique des sept isolats.67*
Tableau 6:.*Evaluation quantitative de la production enzymatique. _____ 69*
Tableau 7: *Mise en évidence de l'activité amylolytique des extraits enzymatiques. _____ 70*
Tableau 8: *Résultats de formation de biofilm par les souches de Bacillus.sp par la méthode Rouge Congo(RCA).____ 80*

Table des matières

INTRODUCTION ---------- **1**

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ---------- **4**

LES BACTERIES PROMOTRICES DE CROISSANCE ---------- 5

1. Définition ---------- *5*

2. Mécanisme d'action ---------- *6*

2.1 Biofertilisation ---------- 6

2.1.1 d'azote ---------- 6

2.1.2 Solubilisation des Phosphates ---------- 7

2.1.3 Solubilisation des Potassiums ---------- 8

2.1.4 Production des sidérophores ---------- 9

2.2. Phytostimulation ---------- 10

2.3. Antibiose ---------- 11

2.4. Production d'enzymes hydrolytiques ---------- 11

2.5. Compétition ---------- 11

2.6. Résistance systémique induite ---------- 12

3. Diversité taxonomique ---------- *12*

3.1. Proteobacteria ---------- 12

3.2. Actinobacteria ---------- 13

3.3. Firmicutes : ---------- 13

II. LE GENRE BACILLUS ---------- 14

1. Taxonomie ---------- *14*

2. Caractéristiques bactériologiques ---------- *15*

3.Caractéristiques physiologiques ---------- *16*

4. Caractères écologiques ---------- *17*

5. Utilisations et applications ---------- *18*

III. ENZYMES HYDROLYTIQUES ---------- 19

1. Définition et intérêt ---------- *19*

2. Application biotechnologiques ---------- *20*

2.1. Application agricole ---------- 20

2.2. Application agro-alimentaire ---------- 21

2.2.1. Production des fromages ---------- 21

2.2.2. Fabrication des jus et nectars de fruit ---------- 21

2.3. Industrie des détergents ---------- 22

2.4. Désencollage de textile---23
2.5 Industrie de cuir---23
2.6. Industrie du papier et du pâte ---24
3. Applications industrielles futures---*25*

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES ---27

I. MATERIEL ---28
1. Matériel non biologique ---*28*
2. Matériel biologique---*28*
2.1. Bactéries appartenant au genre Bacillus---28
II. METHODES ---29
1. Revivification des isolats---*29*
2. Criblage de l'activité enzymatique ---*30*
2.1. Lipase---30
2.2. Protéase ---30
2.3. Cellulase ---31
2.4. Uréase ---31
2.5. Gélatinase---31
2.6. Phosphatase---32
2.7. Nitrate réductase ---32
2.8. Pectinase ---32
2.9. Lécithinase et la lipoprotéinase---32
2.10. Amylase ---33
3. Influence des paramètres physico-chimique sur la production d'amylase ---*33*
3.1. Effet de la température---33
3.2. Effet du potentiel hydrogène---33
3.3. Effet de la salinité---34
3.4. Effet de la quantité d'amidon ---34
4. Evaluation quantitative sur la production d'amylase ---*34*
4.1 Dosage de glucose---35
5. Extraction et purification de l'amylase ---*35*
5.1. Préparation de l'extrait de culture---35
5.2. Précipitation au sulfate d'ammonium---36
5.3. Dialyse ---36

6. Identification phénotypique ---- *36*
6.1. Etude macroscopique ---- 36
6.2. Etude microscopique ---- 36
6.3. Caractérisation biochimique ---- 37
6.3.1. Le test de catalase ---- 37
6.3.2. Test oxydase ---- 38
6.3.3. Test de mobilité ---- 38
6.4. Caractérisation physiologique ---- 38
6.4.1. Température ---- 39
6.4.2.PH ---- 39
6.4.3. La salinité ---- 39
6.5. Caractérisation métabolique ---- 39
6.5.1. Fixation d'azote ---- 39
6.5.2. Production de sidérophores ---- 39
6.5.3. Formation de biofilm ---- 40
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION ---- 41
I. CRIBLAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE ---- 42
1.1 Lipase ---- *42*
1.2. Protéase ---- *44*
1.3. Cellulase ---- *46*
1.4. Uréase ---- *48*
1.5. Gélatinase ---- *49*
1.6. Phosphatase ---- *50*
1.7. Nitrate réductase ---- *52*
1.8. Pectinase ---- *53*
1.9.Lécithinase et lipoprotéinase ---- *54*
1.10. Amylase ---- *57*
2. OPTIMISATION DE L'ACTIVITE AMYLOLYTIQUE ---- 59
2.1. Effet de la température ---- *59*
2.2. Effet de pH ---- *61*
2.3. Effet de la salinité ---- *64*
2.4. Effet de la quantité d'amidon ---- *67*
3. EVALUATION QUANTITATIVE SUR LA PRODUCTION D'AMYLASE ---- 68

4. EXTRACTION ET PURIFICATION D'AMYLASE ---- 70
5. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE ---- 70
5.1. Etude macroscopique ---- *70*
5.2. Etude microscopique ---- *71*
5.3. Caractérisation biochimique ---- *72*
5.3.1. Catalase ---- 72
5.3.2. Oxydase ---- 73
5.3.3. Mobilité ---- 74
5.4. Caractérisation physiologique ---- *75*
5.4.1. Tolérance aux pH ---- 75
5.4.2 Tolérance à la température ---- 76
5.4.3. Tolérance à la salinité ---- 76
5.5. Caractérisation métabolique ---- *77*
5.5.1. Fixation d'azote ---- 77
5.5.2. Production de sidérophores ---- 78
5.5.3. Evaluation de la formation de biofilm ---- 79
CONCLUSION ---- 82
ANNEXES ---- 85
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ---- 96

Introduction

Les technologies modernes sont axées vers des considérations de plus en plus environnementales. Le remplacement des produits chimiques par une alternative biologique, biodégradable rend l'impact sur l'environnement et la santé public moins néfaste. Cet axe de recherche permet aussi de contribuer à économiser l'énergie par l'utilisation des ressources biologiques renouvelables et durables.

Depuis très longtemps, les enzymes ont toujours fait partie de notre vie quotidienne (Nobel et Museum, 2004). Elles sont présentes dans toutes les cellules et sont indispensables pour la survie de toutes les espèces vivantes. Un avantage pouvant être utilisé par certaines industries dans différents domaines. En1998, le marché mondial des enzymes a été estimé à environ 1.5 milliard de dollars et des augmentations allant de 2% à 25% de ce chiffre annuellement, dépendant du domaine ont été signalés (Van Bielen et Li, 2002). La demande mondiale au niveau industriel pour les enzymes d'origine microbienne croit d'une année à l'autre et ce afin d'améliorer certains procédés de fabrications tels que l'industrie du textile (décoloration de jeans par exemple), la papeterie (procédé de blanchiment de la pâte à papier...), dépollution (attaque des substances phénoliques...), industrie alimentaire (boulangerie…) (Dvail et al., 2010). Pour faire face à la demande croissante des industriels notamment dans le domaine des biocatalyses et en se basant sur le modèle de la synthèse organique pour aboutir à une chimie verte plus respectueuse de l'environnement, de nombreux efforts ont été fournis pour la recherche d'enzymes d'intérêt industriel notamment les enzymes hydrolytiques.

Une attention particulière pour les enzymes provenant de genre Bacillus a fait l'objet de plusieurs études. En effet, les Bacillus ont développé des stratégies très variées pour s'adapter aux contraintes physico-chimiques auxquelles ils font face (température, pression, salinité et pH). Les enzymes qui participent à ces stratégies seront sans doute d'un grand intérêt pour intervenir dans les procédés industriels surement travaillant en conditions de haute température ou de grande salinité (Gregoire et al., 2009).

L'enjeu est de pouvoir remplacer les anciennes méthodes chimiques par des technologies biologiques respectueuses à l'environnement et à la santé public. Dans ce contexte, le présent travail a pour objectif :

- Le criblage de l'activité enzymatique (lipase, amylase, protéase, phosphatase, cellulase, uréase, pectinase, gélatinase, Lécithinase et la lipoprotéinase, nitrate réductase) de cinquante-trois souches bactériennes appartenant au genre Bacillus dans les conditions standards.
- La mise en évidence des bactéries productrice de l'amylase extracellulaire.
- L'optimisation de la production d'amylase.
- Dosage de l'activité α-amylasique**.**
- La caractérisation des isolats producteurs d'amylase.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Les bactéries promotrices de croissance

1. Définition

Les bactéries promotrices de croissance sont des communautés bactériennes phyto-bénéfiques qui améliorent la croissance et le développement des plantes. Sont connues sous l'abréviation de PGPB, qui est une abréviation de l'expression anglaise « Plant Growth Promoting Bacteria » (Abnatura, 2013).

Les PGPB sont divisés en deux grands groupes en fonction de leur relation avec les plantes hôtes : les bactéries libres (non rhizosphériques), vivant dans le sol et n'utilisant pas les exsudats racinaires pour leur croissance et les bactéries sous l'influence des plantes, et qui sont soit libres (rhizosphérique) ou en associations avec les plantes et qui sont sous un effet direct des composés organiques présents dans les racines, elles sont des souches très compétitives capables de coloniser la surface des plantes (rhizoplan et phyllosphère) ou à l'intérieur des plantes (endosphère) (khan, 2005).

L'effet positif exercé par les PGPB est réalisé à travers divers mécanismes, qui peuvent être regroupés en deux groupes : mécanismes directs et indirects (Fig.1) (Prashar et *al.,*2013). Les mécanismes directs englobent ceux qui affectent la régulation de la croissance des plantes, alors que les mécanismes indirects sont liés aux mécanismes de défense par leur effet antagoniste contre la microflore néfaste.

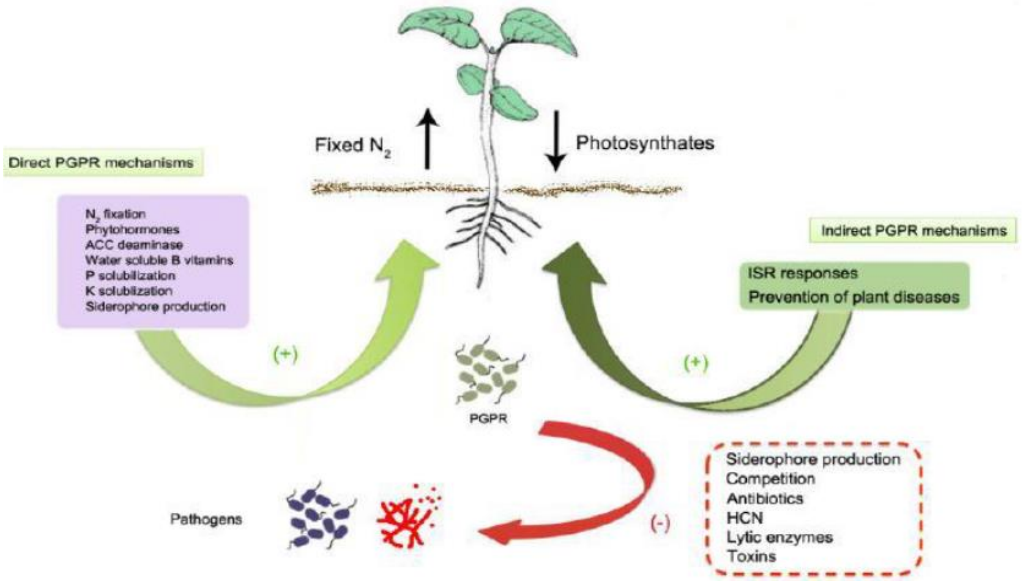


Figure 1: Modes d'action des bactéries promotrices de croissance des plantes (Garcia et al.,2015).

2. Mécanisme d'action

Les mécanismes d'action que soit ceux qui ont un effet direct ou indirect sur la croissance et la productivité des plantes, pouvant être actifs simultanément ou séquentiellement à différentes étapes de la croissance des plantes. Les mécanismes directs permettent la promotion directe de la croissance des plantes peut se produire par deux processus : La biofertilisation et la phytostimulation alors que les mécanismes indirects impliquent les différents modes d´action des agents microbiens dans le biocontrôle.

2.1 Biofertilisation

Les biofertilisants augmentent la disponibilité des éléments nutritifs essentiels aux plantes tel que l'azote, le phosphate, le potassium grâce aux divers procédés biologiques.

2.1.1 d'azote

L'azote est un élément nutritif essentiel pour plusieurs activités chez les plantes. Malgré sa grande disponibilité dans l'atmosphère sous la forme gazeuse (N2), les plantes ne peuvent pas Fixation l'assimiler sous cette forme (N2) (Pujic et Normand, 2009 ; Arora et *al*., 2012).

L'azote atmosphérique ne peut être transféré sous une forme assimilable (ammoniaque, nitrate et nitrites) pour les plantes que sous l'action des bactéries. Les bactéries libres du sol ont le pouvoir de réaliser une série de réactions, allant de l'ammoniation, nitrification et nitrafication pour avoir comme produit finale le nitrite (N02-). Les bactéries capables d'assurer ces réactions sont nombreuses, mais regroupées sous l'appellation « diazotrophes » il s'agit de : Azotobacter, Bacillus, Pseudomonas, Clostridium, Enterobacter, Klebsiella et Corynebacterium (Tilak et *al.,*2006). Un autre groupe de bactéries dites les bactéries symbiotiques, qui sont en interaction symbiotique avec les plantes, peuvent fixer l'azote atmosphérique et le transférer en ammonium (NH4+) et en nitrate (NO3–) grâce à l'action d'un complexe enzymatique « Nitrogénase » (Fig.2) (Etesami et Adl, 2020). Ce dernier n'est actif qu'à l'intérieur de structure spécialiséenommée « Nodules ».

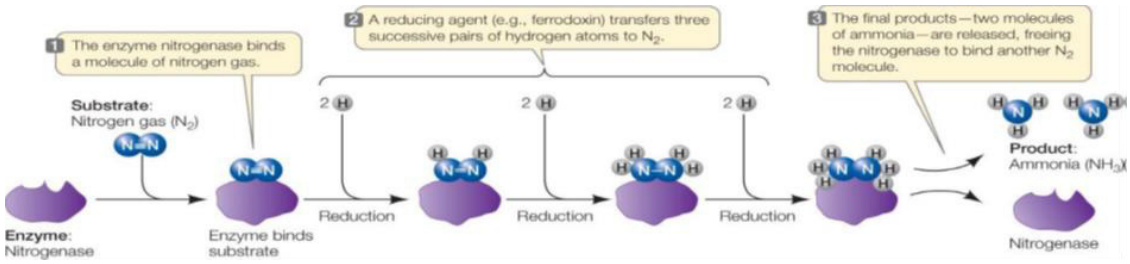


Figure 2: Étapes de conversion de l'azote atmosphérique en ammoniac par la nitrogénase (Mouna, 2007).

2.1.2 Solubilisation des Phosphates

Les bactéries solubilisant le phosphate ou les PSB (Phosphate SolubilizingBacteria) permettent la disponibilité du Phosphore existant dans le sol (Vessey, 2003) pour les plantes par deux mécanismes (Fig.3).

Le premier mécanisme consiste à la libération des acides organiques qui mobilisent le phosphore grâce aux interactions ioniques avec les cations du sel de phosphate conduisant à l'acidification des cellules microbiennes et de leur environnement, cette diminution de pH entraine la dissociation des liaisons dans les composés phosphorés insolubles ce qui rend le phosphate soluble (Afzal et Bano, 2008).

Le deuxième mécanisme est basé sur l'action enzymatique. Des enzymes, tels que des phosphatases non spécifiques (aussi appelés phosphohydrolase), des phytases, des phosphonatases et des C-P lypases, permettent la solubilisation de phosphate organique (Patel et Rajkumar, 2009).

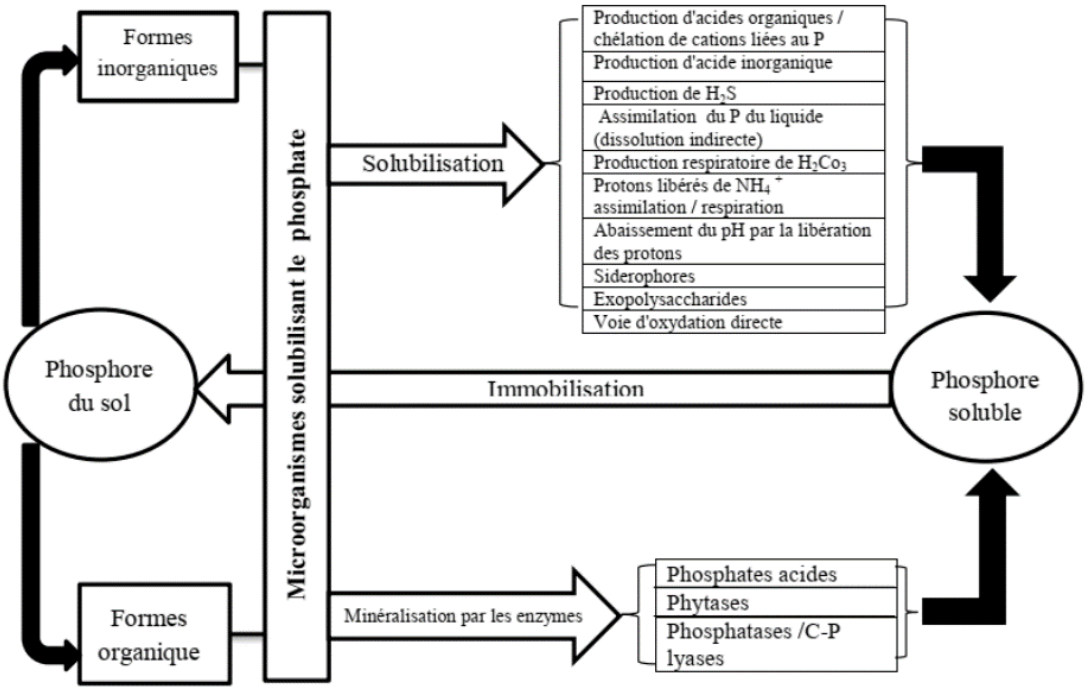


Figure 3: Représentation schématique des mécanismes de solubilisation/minéralisation et immobilisation du phosphate dans le sol par les PSB (Sharma et al.,2013)

2.1.3 Solubilisation des Potassiums

Les bactéries solubilisatrices des potassiums (KSB) jouent un rôle clé dans le cycle K naturel, elles permettent de transformer le Potassium minéral insoluble et inaccessible à une forme disponible pour l'absorption par les plantes (Liu et *al.*, 2012).

Comme le mécanisme de base du PGPR pour solubiliser les P, les PGPR solubilisent les potassiums par différent mécanismes (Fig.4) : par la production des acides organiques et inorganiques comme l'acide gluconique, oxalique α-cétogluconique et citrique qui peuvent soit dissoudre directement le minéral K, soit chélater les ions Al et Si associés aux K minérales (Romheld et Kirkby, 2010), et par l'abaissement du pH du milieu par la libération de différents acides organiques et protons par les micro-organismes solubilisants K (KeshavarzZarjani et *al*., 2013; Parmar et Sindhu, 2013). Il a été signalé que la production de divers polymères extracellulaires principalement des protéines et des polysaccharides peut également entrainer la libération de K à partir de minéraux porteurs de K par une fort absorbation des acides organiques attachés à la surface des minéraux silicatés, ce qui entraîne une forte concentration d'acides autour du minéral (Liu et *al*., 2006). La formation de biofilms sur

les surfaces minérales rhizosphériques participent également à la dissolution des minéraux pour libérer K (Meena et *al*., 2015).

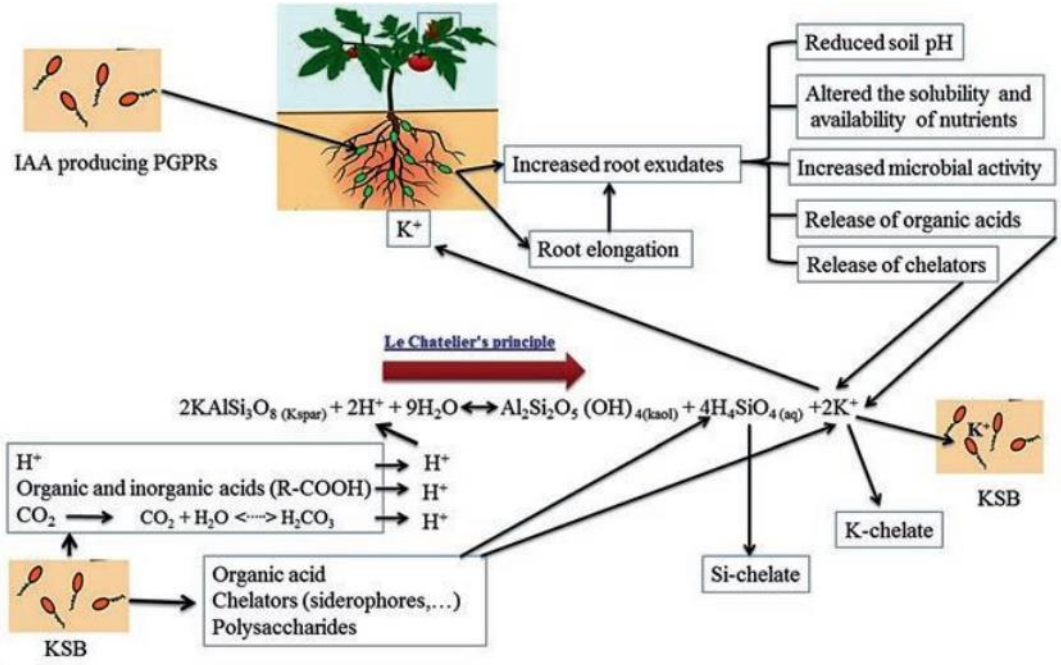


Figure 4*:* Les différents mécanismes de solubilisation de potassium (Etesami et Adl, 2020).

2.1.4 Production des sidérophores

Le fer est considéré comme l'oligoélément le plus important pour la croissance microbienne, il agit comme un régulateur global de nombreux processus cellulaires, métaboliques et biosynthétiques. Dans des conditions de carence en fer, les bactéries aérobies produisent des métabolites secondaires appelés sidérophores pour combler leur besoin en fer.

Les sidérophores (sidéros = fer ; phoros = transport) (Saha et *al*., 2012) sont des composés organiques de faible poids moléculaire (400-1000 daltons) (Castignetti et Smarrelli, 1986) avec une affinité très élevée et spécifique pour chélater le fer. Ces sidérophores se fixent avec l'ion ferrique et forment un complexe sidérophore-ferrique et le transporte vers la cellule microbienne où il se lie avec des récepteurs dépendants de la suspension de fer à la surface de la cellule bactérienne (O'Sullivan et O'Gara, 1991). L'ion ferrique est ensuite relâché et actif dans le cytoplasme comme ion ferreux (forme soluble) (Fig.5). Certains des sidérophores produits (500 sidérophores connus) sont utilisés par une grande variété de plantes et par d'autres micro-organismes comme sources de fer (Crowley, 2006).

De plus les sidérophores peuvent augmenter la disponibilité de Phosphore pour les plantes soit en chélatant les cations tels que Ca^{+2}, Al^{+2} et Fe^{+3} formant des précipitations avec le phosphore ou par échange de ligands (Sharma et *al*., 2013).

Ils sont également utilisés dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes en s'appropriant des ions ferriques présents dans la rhizosphère et ils les rendent non disponibles aux champignons pathogènes, ce qui provoque une diminution de leur croissance. Les bactéries productrices de sidérophores appartiennent aux genres Bradyrhizobium, Pseudomonas, Rhizobium, Serait et Streptomyces (Kuffner et *al.*, 2008).

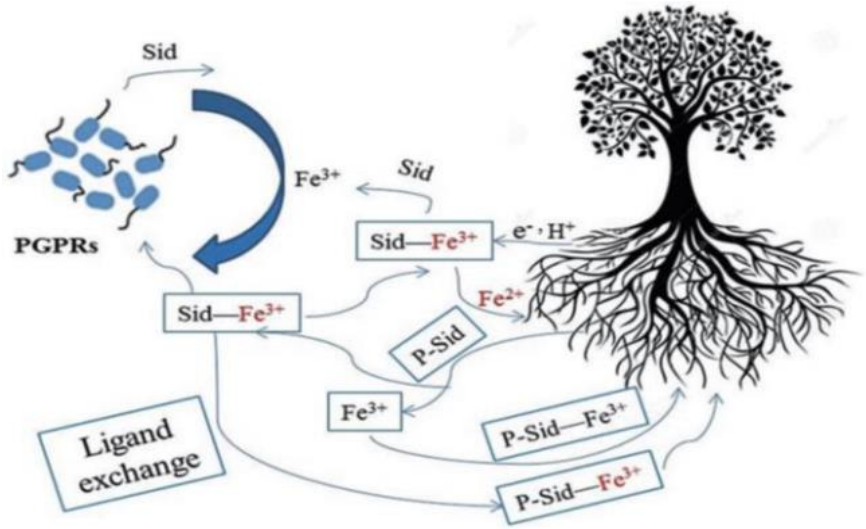


Figure 5: Représentations schématiques du rôle du PGPR producteur de sidérophore (Sid) dans l'amélioration de la disponibilité du fer pour la plante (Etesami et Adl, 2020).

2.2. Phytostimulation

Les phytostimulateurs améliorent la croissance des végétaux par leurs facultés à produire ou à changer la concentration des régulateurs de croissance de la plante (Martinez-Viveros et *al.,*2010).

Une large gamme de microorganismes trouvés dans la rhizosphère est capable de produire des phytohormones pour réguler la croissance et le développement des plantes, ces hormones végétales sont des petites molécules de signal produites en très faible concentration et leur synthèse est finement régulée. Elles sont chimiquement analogues

aux hormones synthétisées par les plantes. Elles influencent les processus biochimiques, physiologiques et morphologiques dans les plantes (Fuentes-Ramírez et Caballero-Mellado, 2005), et aussi jouent un rôle important dans la réponse de la plante aux stress biotiques et abiotiques (SkiryczetInze,2010; Fahad et *al.,* 2015). Les phytohormones sont divisées en cinq groupes : les auxines (AIA), les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et un groupe appelé inhibiteurs, qui comprend l'acide abscissique (ABA) (Shi et *al.,*2017).

2.3. Antibiose

L'antibiose est une activité antagoniste utilisée par les bactéries pour la prévention des attaques des pathogènes et pour la suppression et le contrôle des maladies d'origine biotique (Shilev, 2013). Elle repose sur la production à de faibles concentrations des métabolites secondaires de nature diverse aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques (Melin et *al*., 2007), comme : les lipopeptides cycliques, les sidérophores, le cyanure d'hydrogène HCN, oomycinA, zwittermycin. (Akhtar et Siddiqui, 2010).

2.4. Production d'enzymes hydrolytiques

L'amélioration de la croissance par l'activité enzymatique inclus la production par les PGPR des enzymes hydrolytiques telles que les chitinases, les lipases, les phosphatases, les protéases,…(Nadeem et *al*., 2013), qui jouent un rôle clé dans la décomposition de la matière organique dans les écosystèmes, dans l'inhibition de développement et de croissance des microorganismes phytopathogènes (Ordentlich et *al.,* 1988) et dans la protection des plantes contre les stresses biotiques et abiotiques.

2.5. Compétition

La compétition entre deux ou plusieurs microorganismes sur les éléments nutritifs, l'espace ou les autres facteurs environnementaux nécessaires pour la vie est un mécanisme biologique utilisé par les bactéries pour éliminer les phytopathogènes en réduisant le nombre de sites habitables et par conséquent, leur croissance (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Shameer et Prasad, 2017). En effet une bactérie à croissance rapide pourrait éliminer les pathogènes fongiques par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie. Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant le potentiel colonisateur d'une souche sont la mobilité (présence d'un

flagelle), le chimiotactisme et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines en tant que sources de carbone et d'azote (Grover 2004).

2.6. Résistance systémique induite

La résistance systémique induite est une forme de résistance, stimulée spécifiquement par les bactéries pour protéger les végétaux contre les attaques des virus, des bactéries et des champignons (Naznin et *al.*, 2012). Ce mécanisme permet de rendre la plante plus résistante à l´agression future par des agents pathogènes.

Cette « immunité » s'initie suite à la perception par la plante de molécules dites « élicitrices » produites par le microorganisme bénéficiaire (Cherif, 2014) ainsi de nombreux composants bactériens tel que les lipopolysaccharides (LPS), sidérophores, lipopeptides cycliques, peuvent induire une résistance systémique des plantes (Gupta et *al*., 2015 ; Shameer et Prasad, 2017).

3. Diversité taxonomique

La diversité fonctionnelle et taxonomique des communautés bactériennes bénéfiques est fortement influencée par des facteurs biotiques et / ou abiotiques (Fierer et *al*., 2012a). Cette variation permet de caractériser de nombreux genres appartenant aux différents phylums, les plus abondants et omniprésents de ces phylotypes comprenant : Proteobacteria, Actinobacteria et Firmicutes (Janssen, 2006).

3.1. Proteobacteria

Les membres du phylum des protéobactéries telluriques sont regroupés en trois classes:Alphaproteobactéries, Bêtaproteobactéries et Gammaproteobactéries.

Alpha-proteobacteria

Alpha-proteobacteria possède comme tous les classes de proteobacteria la capacité de se développer même si la quantité des nutriments est très faible (Tortora et *al*., 2011).

Les PGPB appartenant à cette classe et qui sont les plus connus sont les Rhizobia, ils sont considérés comme des PGPB grâce à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique et à noduler les plantes appartenant à la famille des légumineuses (Andrews et Andrews, 2017).Les Rhizobiapeuvent être aussi utilisés comme agents de bio-contrôle (Antoun et Prévost, 2005). Cette classe regroupe les bactéries faisant partie du genre Rhizobium,

Bradyrhizobium, Sinorhizobium, Mesorhizobium et Gluconacetobacter (Sawada et *al*., 2003).

Bêta-proteobacteria

Cette classe, comprenant la famille Burkholderiaceae qui contient des souches PGPB omniprésentes appartiennent au genre Ralstonia et au genre Burkholderia. Le genre Burkholderia forme un groupe monophylétique qui contient diverses espèces ayant des propriétés physiologiques et écologiques variées (Moulin et *al*., 2001).

Gamma-proteobacteria

C'est la classe de bactéries la plus nombreuse comprenant des microorganismes très diversifiés sur le plan physiologique. Parmi les familles appartenant à cette classe et considérées comme des PGBR ; la famille des Pseudomonadaceae qui renferme le genre Pseudomonas et le genre Azotobacter composé de bactéries qui favorisent la croissance des plantes à cause de leur capacité à fixer l'azote sans noduler les plantes (Sturz et Christie, 2003). De plus, la famille Enterobacteriaceae qui inclut des genres assurant la fonction de PGPR comme Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella et Serratia (Garrity, 2005).

3.2. Actinobacteria

Les membres du phylum Actinobacteria constituent en moyenne 13% des communautés bactériennes du sol. Ce phylum contient trois sous classes : Actinobacteridae, Acidimicrobidae et Rubrobacteridae. Dans cet embranchement, le genre Frankia est le plus connu pour sa capacité de fixation symbiotique de l'azote. De nombreuses études montrent que les Actinobactéries peuvent coloniser des environnements arides, des sols désertiques et même des déserts chauds et froids (Santhanam et *al*., 2013). Ces bactéries ont la capacité de produire une multitude de métabolites secondaires, y compris les deux tiers de tous les antibiotiques connus ainsi que de nombreux agents anticancéreux, antifongiques et immunosuppresseurs (Berdy, 2005; Hopwood, 2007; Barka et *al*., 2016).

3.3. Firmicutes :

Les membres du phylum Firmicutes sont largement observés dans les sols désertiques et peuvent être comparativement plus abondants que dans d'autres biomes (Fierer et *al*.,

2012b). Certains genres du phylum Firmicutes, sont capables de former des endospores qui peuvent faciliter la survie dans des conditions défavorables comme Paenibacillus et Bacillus qui est le genre le plus commun et le plus prédominant, ils représentent 95% de la flore isolée.

II. Le genre Bacillus

1. Taxonomie

Les Bactéries du genre Bacillus appartiennent à l'embranchement des Firmicutes, classe des Bacilli, ordre des Bacillales, Famille des Bacillaceae. Ce genre comprend 377 espèces selon la dernière mise à jour en Janvier 2019 (Caulier et *al.,*2019) et sont réparties en trois groupes en fonction de la morphologie et la position de l'endospore. Il s'agit de :

Groupe I : Rassemble les bacilles dont les spores d'aspect ovale ou cylindrique, central ou terminal, ne sont pas déformantes (*Bacillus cereus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus megaterium*).

Groupe II : Comprend les bacilles dont les spores ont une silhouette ovale, de position centrale ou terminale, modifiant la forme du corps de la bactérie (*Bacillus circulans*, ...).

Groupe III : Réunit les bacilles dont les spores rondes, terminales ou subterminales déforment le corps bacillaire (*Bacillus sphaericus*...) (MEDANE, 2017).

Ce genre englobe une variété d'espèces phénotypiquement hétérogènes, présentant un large éventail de besoins nutritionnels, de diversité physiologique et métabolique ainsi que dans la composition en base d'ADN (Claus et Berkeley, 1986a).

Historiquement, *Bacillus subtilis*a été décrite la première fois sous le nom de *Vibriosubtilis*par Ehrenberg en 1835. En 1864 Davaine attribut le nom Bacteridium au microorganisme associé à l'anthrax. Finalement, le genre Bacillus a été proposé pour la première fois en 1872 par Ferdinand Cohn pour inclure les bactéries en forme de bâtonnets qui se développent dans les filaments (Berkeley, 2002). En 1872, Ferdinand Cohn, un élève de Robert Koch, reconnut et nomma la bactérie *Bacillus subtilis* (Logan et Vos, 2015).

Les premières tentatives de classification des espèces de Bacillus sont fondées sur deux caractéristiques : la croissance aérobie et la formation d'endospores de deux

espèces formant des endospores, *Bacillus anthracis*et *Bacillus subtilis,* le genre a atteint 146 espèces dans la cinquième édition du Bergey's Manuel (Bergey et *al*., 1939). Par la suite, le nombre de nouvelles espèces a augmenté régulièrement grâce à l'application de méthodes variées pour l'enrichissement et l'isolement tenant compte de la diversité physiologique et des besoins nutritionnels et culturels de ces organismes (Maughan et van der Auwera, 2011), selon ces caractères les espèces du genre Bacillus sont regroupés en six grands groupes (Tab. 2) (Priest et *al*., 1993).La taxonomie du genre Bacillus a été loin d'être établie car plusieurs espèces initialement décrites comme Bacillus ont été transférées vers des genres voisins, suite à l'analyse comparative des séquences de base de L'ARN ribosomal 16S (dont la teneur en guanine et en cytosine (G+ C%) de ces espèces connues est comprise entre 32 et 69 moles pour cent (Vargas et *al*., 2005).

Tableau 1: Taxonomie du genre Bacillus (Priest et al., 1993)

Groupes	Espèces représentantes	Caractéristiques
Groupe I	*B. polymyxa*	Anaérobies facultatives, fermentent une variété de sucres. Besoins de croissance : vitamines et acides aminés. Sécrètent : amylases, glucanases pectinases et pullulanases.
Groupe II	*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* et *B. amyloliquefaciens*	Endospores ovales, aérobies stricts pour la plus part des espèces. Certaines espèces sécrètent de nombreuses enzymes extracellulaires : les ß-glucanases et protéases.
Groupe III	*Brevibacillus brevis*	Taxonomiquement moins définis.
Groupe IV	*B. sphaericus*, *B. insolitus*, et *B.psychrophilus.*	Groupe phylogénétiquement homogène. Tous aérobies stricts. Méso-diaminopimélique du peptidoglycane est remplacé par de la lysine ou de ornithine.
Groupe VI	*B. stearothermophilus*	Thermophiles. Groupe physiologiquement et morphologiquement hétérogènes. Métabolisme diverses allant de la aérobies stricts à des types microaérophiles.
Groupe VII	*Alicyclobacillus (genre)*	Thermophiles acidophiles.

2. Caractéristiques bactériologiques

Les espèces du genre Bacillus sont des bacilles de taille variable (de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm), bâtonnets, rectilignes à extrémités carrées ou arrondies (Fig.10a), à Gram positif ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que pour les très jeunes cultures), capables de produire des endospores (Fig.10b) qui

leurs permettent de survivre des longues périodes dans des conditions environnementales défavorables (Schleifer, 2009), parfois capsulés (*Bacillus anthracis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*et *Bacillus subtilis*peuvent élaborer une capsule formée d'un polymère d'acide glutamique), généralement mobiles (Fig.10c) grâce à une ciliature péritriche , aérobies ou aéro-anaérobies facultative (Guinebretiere et *al.,* 2008), le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase. La gamme de température de croissance varie en fonction des souches et s'étend de 5°C à 50°C. Les espèces de ce groupe sont omniprésentes fréquemment retrouvées dans le sol, l'eau, les poussières et sur les végétaux. Certaines espèces se retrouvent dans le tube digestif des animaux où elles établissent une relation d'endosymbiose avec leur hôte (Hong et *al.,*2005).

3.Caractéristiques physiologiques

Les Bacillus sont phénotypiquement et génétiquement hétérogènes. Ils exhibent diverses propriétés physiologiques, ils sont capables de dégrader la plupart des dérivés animaux ou végétaux (cellulose, amidon, protéines, hydrocarbures…). Ce sont des producteurs d'antibiotiques, nitrificateurs, hétérotrophes, dénitrifiants, fixateurs d'azote, précipitateurs de fer, oxydants de sélénium, oxydants et réducteurs de manganèse. Ces microorganismes sont des chimiolithotrophes facultatifs, des acidophiles, des alcalophiles, des psychrophiles et des thermophiles (Schleifer, 2009), halotolérants ou halophiles (Upadhyay et *al.,* 2009) ont constaté que la plupart des bactéries pouvaient tolérer jusqu'à 8% de NaCl et appartenir au genre Bacillus, de nombreuses espèces halophiles comme *Bacillus xiaoxiensis*(Chen et *al.,* 2010), *Bacillus chagannorensis*(Carrascoet*al.,* 2007) et *Bacillus coahuilensis*(Cerritos et *al.,* 2008), et halotolérants comme *Bacillus luteolus*(Shi et *al.,* 2011) et *Bacillus seohaeanensis*(Lee et *al.,* 2006) sont largement répartis dans différents environnements salins et hypersalins (McGenity et *al.,* 2000). Ces bactéries sont capables de croître à des valeurs de pH, de température et de concentrations de sel où peu d'autres organismes peuvent survivre. Les espèces de Bacillus sont reconnues pour produire une grande variété de molécules biologiquement actives incluant des polyketides, des lipopeptides, des sidérophores et des peptides (Hamdache et *al*., 2013). Les Bacillus peuvent produire au moins une enzyme extracellulaire ce qui peut inclure différentes protéases, nucléases, phosphatases et lipases (Slepecky et Hemphill, 2006).

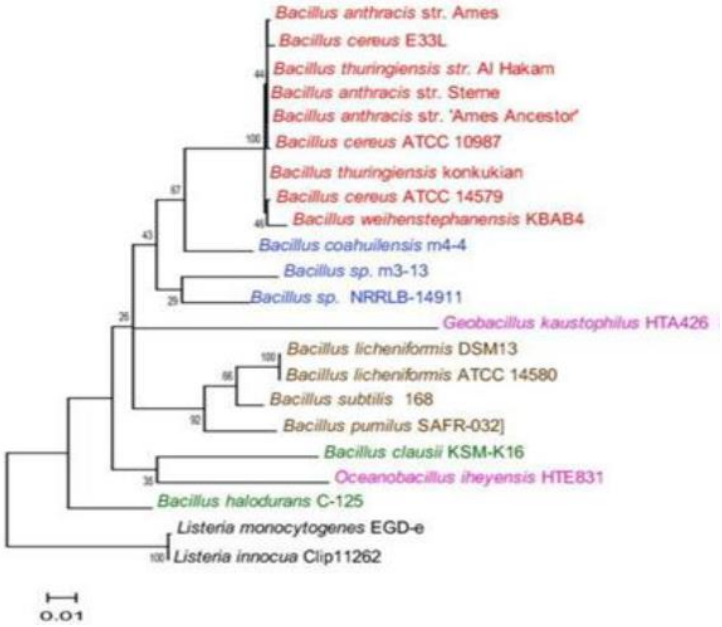


Figure 6: Reconstruction phylogénétique des Bacillus basée sur l'ARN 16S (Maughan et Van des Auwer, 2011).

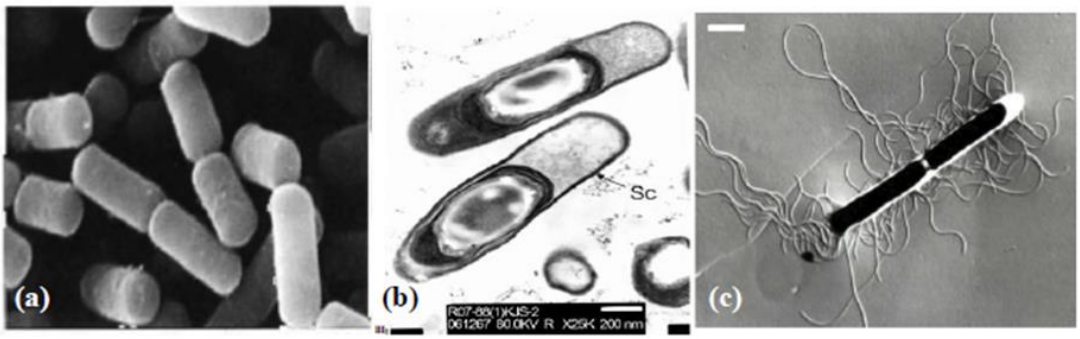


Figure 7: Observation au microscope électronique de cellules végétatives de Bacillus cereus(a) (Lund et Granum, 1996), des spores de Bacillus polyfermenticus(b) (Kim et al., 2009) et de la ciliature péritriche de Bacillus subtilis(c) (Luis et al., 2009).

4. Caractères écologiques

Les Bacillus sont des germes de l'environnement, saprophytes et ubiquitaires ils sont largement distribués dans l'environnement (Schleifer, 2009) grâce à leurs capacités à former des spores et grâce aux capacités physiologiques et métaboliques diverses des formes végétatives qui leur permet de vivre dans une large variété d'habitats tels que les plantes, les sols, l'eau de mer, ainsi que de nombreux habitats extrêmes tels que les sables du désert et les sources chaudes, bien que quelques espèces soient pathogènes pour des

mammifères (*Bacillus anthracis*) et des insectes (*Bacillus sphaericus et Bacillus thuringiensis*). Leur habitat principal est le sol et la rhizosphère, elles sont aussi été retrouvées dans les épiphytes ou les endophytes des plantes (Holl et Chanway, 1992). Les techniques moléculaires utilisées pour étudier la diversité ont montré que la majorité des bactéries Gram-positives de différents types de sol, sont des Bacillus (Garbeva et*al.,*2003) qui partagent leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres Pseudomonas et Actinomycetes. Les espèces retrouvées en abondances dans les échantillons de sols sont *Baciluussubtilis*et *Bacillus cereus*(Pérez-Garcia et *al*., 2011).

5. Utilisations et applications

Les membres du genre Bacillus constituent de bons candidats pour diverses applications : agricoles, industriels, agroalimentaires et pharmaceutiques (Senesi et *al.,*2004). Le genre Bacillus est le genre bactérien le plus étudié dans la recherche scientifique et le plus utilisé en agriculture, certaines espèces de Bacillus comme *Bacillus subtilis*(Qureshi et *al*., 2012) *Bacillus megaterium*(Ding et *al*., 2005 ; Anand et Chanway, 2013), *Bacillus licheniformis*(Kayasth et *al.,* 2013), *Bacillus amyloliquefaciens*(Borriss, 2015) peuvent être utilisées comme un biofertilisant efficace dans la promotion de la croissance et l'amélioration du rendement des cultures en augmentant l'offre ou la disponibilité de nutriments primaires à la plante hôte ou par la synthèse de substances améliorant la décomposition des résidus végétaux.Aussi, de nombreuses recherches montrent que le genre Bacillus possède une grande activité dans le contrôle biologique par la protection des plantes contre les maladies liées au sol soit par l'antagonisme via la production des antibiotiques (*B*acillus *subtilis, Bacillus pumilus*et *Bacillus Licheniformis*(Cawoy et *al.,* 2012)) et des enzymes lytiques (Chitinases, protéases et lipases)(*Bacillus cereus*synthétise une enzyme chitinolytique qui est utilisé dans le biocontrôle contre *Rhizoctoniasolanisp*(Bouznad, 2016)et *Bacillus licheniformis*(Cawoy et *al.,* 2012)).Le biocontrôle peut aussi s'interposer par l'induction de la résistance systémique (ISR) (L'espèce *Bacillus mycoides*qui induit la résistance de betterave à sucre (Bouznad, 2016)) ou agissent comme des phytostimulateurs par la modification des niveaux hormonaux des plantes (LARADJ, 2017).

En outre, les espèces du genre Bacillus sont impliquées dans la production des métabolites primaires telle que : les ribonucléosides et les vitamines (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megateriun*(Moore *et al.*, 2014), *Bacillus amyloliquefaciens*(Byung, 2011) et

Bacillus licheniformis(VAJARANANT et FIELDS, 1989), la production des enzymes pour les détergents, les textiles, les papiers et les aliments comme l'amylase et la protéase (Schallmey et *al*., 2004) (*Bacillus clausii*, *Bacillus amyloliquefaciens*et *Bacillus halodurans*) (Schallmey et *al*., 2004; Saeki et *al*., 2007) ,ainsi que la synthèse des peptides antibactériens utilisés dans le secteur alimentaire (Kivanc et *al*., 2014) à la place des additifs chimiques (Landman et Quévrain, 2016) . Ils sont aussi utilisés dans la fermentation de certains aliments (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*) (Nguimbi, et *al.,*2012), dans la détection des résidus d'antibiotiques dans le lait et les produits laitiers (*Bacillus subtilis*) (Bagre et *al*., 2015) et certains sont susceptibles de jouer un rôle de probiotique (Vouidibio, 2016) (*Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*et *Bacillus coagulans*) (Ripamonti et *al.,* 2009 ; Endres et *al.,* 2011).

De plus, les Bacillus sont aussi utilisés comme modèles dans la recherche pour mieux comprendre les processus cellulaires tels que la réplication, le cycle cellulaire, la division et la sporulation (Graumann, 2007).

Et dans le domaine pharmaceutique, ils sont utilisés en vaccinologie, dans le diagnostic de certaines pathologies (*Bacillus subtilis*) (Bouhairi, 2017) et dans la production de certains antibiotiques utilisés à des fins médicales comme la polymyxine et la subtiline, par *Bacillus subtilis* ; La gramicidine par *Bacillus brevis;* la zwittermicine par *Bacillus cereus*; circuline par *Bacillus circulans*; la bacitracine par *Bacillus licheniformis*(Awais et *al*., 2010).

III. Enzymes hydrolytiques

1. Définition et intérêt

Les enzymes hydrolytiques ou les hydrolases sont une grande classe de plus de 200 enzymes qui ont qui provoquent la coupure d'une molécule et fixent les radicaux H et OH de l'eau sur les valences libérées. Ces enzymes ne nécessitent pas généralement de coenzymes, elles sont activables par des cations. Elles interviennent sur les fonctions éthers, acétals, esters phosphoriques, liaisons O-O desperoxydes, C-N des amides (Bornscheuer, 2002).

Au cours des trois dernières décennies, l'utilisation d'hydrolases pour la catalyse de processus organiques respectueux de l'environnement dans des conditions de réaction douces a été bien documentée (Leisola et al., 2001). Les hydrolases se sont révélées être

des outils idéaux pour l'accélération des transformations synthétiques en raison de leur grande stabilité catalytique, efficacité, disponibilité commerciale et large spécificité de substrat dans un large spectre de procédés biocatalysés (Patel et al., 2005).

Bien que les enzymes hydrolytiques sont très diverses, il existe quelque enzymes qui ont montré un grand intérêt dans les différents domaines de la biotechnologie.il s'agit des : Amylases, Protéases, pectinase, cellulase, chitinase, lipase, gélatinase, phosphatase, uréase.

2. Application biotechnologiques

Les enzymes hydrolytiques que soit d'orignine bactérienne ou microbienne peuvent avoir plusieurs applications biotechnologique (fig 8).

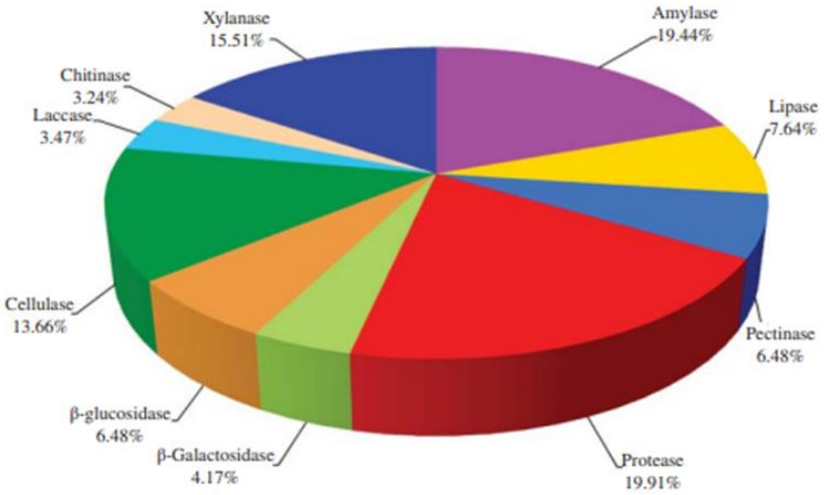


Figure 8: Distribution des enzymes hydrolytiques pour diverses applications biotechnologiques.

2.1. Application agricole

Les enzymes hydrolytiques agissent comme des biofertilisants. Le biofertilisant, d'une manière générale, est composé de substances le plus souvent dégradables et de micro-organismes du sol, qui maintiennent collectivement la composition des micro-organismes et des nutriments majeurs pour le développement et la croissance des plantes (Vessey, 2003). Le biofertilisant est peut-être appliqué au sol, aux semences, aux surfaces des plantes et à la région rhizosphérique, ce qui favorise la croissance en maintenant la disponibilité des nutriments pour la plante.

Les microorganismes utilisés comme biofertilisants constituent un arsenal d'enzymes qui font partie intégrante de diverses activités métaboliques de la plante favorisant la croissance de la plante. Il s'agit principalement des : phosphatase, nitrate réductase, protéase, β-Glucosidases.

2.2. Application agro-alimentaire

2.2.1. Production des fromages

La première étape de la transformation du lait en fromage est la coagulation. Quand elle s'effectue par la voie enzymatique, elle résulte d'une déstabilisation de la fraction caséinique par hydrolyse spécifique de la caséine sous l'action de chymosine (E.C.3.4.23.4). Dans la présure extraite de la caillette de veau nourri au lait, cette enzyme se trouve en compagnie d'une autre protéase coagulante. La protéase détermine le rendement fromager.

La texture, la saveur et l'arôme du fromage sont la résultante de modifications physico-chimiques des fractions protéiques et lipidiques consécutives à l'action des enzymes des micro-organismes. Les protéases et les lipases impliquées dans le déroulement de l'affinage. De nombreuses études ont été réalisées pour tenter d'accélérer le déroulement de l'affinage, pour en réduire les coûts, notamment dans le cas de pâtes pressées.

Les effets les plus marquants de cette addition d'enzymes sont obtenus avec les lipases. L'hydrolyse des acylglycérols conduit en effet à des acides gras qui ont une action importante sur les caractéristiques olfactives de certains fromages et notamment les pâtes persillées (roquefort, bleu des Causses, bleu d'Auvergne...) par suite de leur transformation en cétoacides, méthylcétones, lactones. De même, l'addition de lipases à du lait de vache peut générer des flaveurs proches de celles obtenues à partir de lait de chèvre et de brevis. Celles-ci sont utilisées en fabrication de féta, manchego et romano à partir de lait de vache. La note de fromage bleu peut être également renforcée par certaines lipases. Dans le cas de certains formages (ras-kopaniste), l'apport de lipases à du lait pasteurisé permet d'obtenir des flaveurs proches de celles obtenues à partir du lait cru.

2.2.2. Fabrication des jus et nectars de fruit

Les opérations de macération, d'extraction et de filtration dans la préparation de jus et de nectars de fruits sont des opérations qui mettent en œuvre systématiquement

non seulement les enzymes du tissu de la plante mais aussi des enzymes hydrolytiques et principalement des pectinases, des hémicellulases et des cellulases. Elles permettent d'améliorer le rendement d'extraction du jus (pressage, liquéfaction), de séparer les cellules lors de la préparation de nectar (macération) et enfin d'obtenir des jus limpides (clarification). Le broyage du fruit provoque la formation d'une phase liquide et plus ou moins visqueuse et d'une phase solide semi-gélifiée ayant donc une forte capacité de rétention d'eau. L'addition d'enzymes pectinolytiques et particulièrement d'endopolygalacturonases à cette étape permet d'augmenter le rendement en jus et de limiter la rétention d'eau par la phase solide, par hydrolyse de la lamelle moyenne des cellules. Une étape de macération peut permettre de profiter des enzymes et ainsi améliorer l'extraction de composés colorants et aromatiques. C'est ce qui est mis en œuvre dans la macération carbonique du raisin et sur d'autres fruits rouges (cassis, framboise, fraise). Ces fruits donnent des pulpes très visqueuses très difficiles à filtrer ou centrifuger industriellement. Dans le cas de la pomme, ces enzymes sont particulièrement utiles pour améliorer le rendement d'extraction du jus de fruits surmaturés travaillés hors saison sur lesquels les rendements d'extraction des jus sont, sans enzyme, de 20 à 25 % plus faible qu'avec enzyme. Dans le cas de la mûre, ce gain peut dépasser 50 % . Si l'hydrolyse des chaînes d'acide polygalacturonique est l'activité majeure recherchée, suivant la composition des pectines du fruit, des enzymes complémentaires peuvent être utiles. Dans le cas de la pomme, l'activité des endopolygalacturonase est améliorée par la présence de pectine estérases. De même, des activités arabinanases, rhamnogalacturonases, amylases ou galactanases peuvent contribuer à améliorer le rendement en jus.

2.3. Industrie des détergents

L'industrie des détergents utilise le plus gros volume d'enzymes, c'est-à-dire 45% du total du marché. Les enzymes utilisées dans ce secteur sont les protéases, les amylases, les cellulases et les lipases. Les enzymes les plus présentes sur le marché sont les protéases bactériennes, dont il existe actuellement une grande variété. Ces enzymes possèdent des propriétés nettoyantes croissantes et une grande stabilité face aux oxydants. Les alpha-amylases sont très efficaces en ce qui concerne la dégradation des chaînes d'amidon, ce qui est la raison pour laquelle elles améliorent l'élimination des particules de poussière et de terre qui restent présentes dans les tissus à cause de la trame des polymères de l'amidon. Utiliser les protéases et les amylases conjointement permet

d'obtenir un meilleur lavage des tissus ; en effet, il y a diminution de la charge des produits chimiques dans le détergent et de la température de lavage. Les cellulases sont quant à elles utilisées à la place des tensioactifs ioniques pour améliorer la douceur des tissus en coton. Elles sont également actives dans l'élimination des particules de poussière et de terre car elles éliminent les microfibrilles des fibres de coton, ce qui produit de plus un effet de brillantage de la couleur. Les lipases catalysent l'hydrolyse des triglycérides présentes dans les taches de graisse, ce qui les rend hydrophiles et permet une élimination facile au lavage. Il faut signaler que les enzymes utilisées dans les détergents ont un impact sur l'environnement positif. Elles entraînent en effet des économies énergétiques dues à la réduction des températures du lavage, permettent la réduction de la teneur en produits chimiques des détergents, sont biodégradables, n'ont pas d'impact négatif dans les processus d'épuration des eaux et ne présentent pas de risques pour la vie aquatique.

2.4. Désencollage de textile

L'amidon est la substance naturelle dont on recouvre le fil à coudre pour augmenter sa résistance avant le tissage. Cet amidon doit être éliminé avant de procéder aux traitements finaux du tissu : blanchiment, teinture, traitements spéciaux, etc. L'élimination traditionnelle s'effectuait auparavant en milieu acide. Aujourd'hui, le désencollage enzymatique utilise des amylases en remplacement de l'acide. L'industrie textile utilise ce procédé biotechnologique depuis le début du XXe siècle. Les amylases sont très efficaces dans le désencollage et ne génèrent pas de problèmes de déchets dangereux pour l'environnement comme c'est le cas des acides minéraux, des bases ou des oxydants

2.5 Industrie de cuir

Le tannage des peaux est l'un des processus industriels aux enzymes les plus anciens. En voici les étapes traditionnelles : séchage, trempage, élimination des poils et de la laine, raclage et tannage. Le tannage utilise de nombreux produits chimiques pour éliminer les poils, les graisses et les protéines non-désirées (élastine, kératine, albumine et globuline), laissant intact le collagène dans l'étape précédant le tannage de la peau. Les produits chimiques utilisés nuisant considérablement à l'environnement, on utilise aujourd'hui des protéases telles que la trypsine et les lipases. Ces substances, qui réduisent l'utilisation des sulfites, des solvants organiques et des tensioactifs synthétiques, permettent d'obtenir un produit doté de meilleures propriétés finales.

2.6. Industrie du papier et du pâte

Le blanchiment est l'élimination de la lignine des pulpes chimiques du papier. Cette étape de la fabrication du papier est nécessaire pour des raisons esthétiques ainsi que pour améliorer les qualités du produit final. Le blanchiment est constitué de diverses étapes et varie en fonction du type de substances utilisées. On utilise traditionnellement pour le blanchiment de la pâte kraft des composés chlorés. Cette méthode produisant des déchets toxiques (mutagènes, cancérigènes, bioaccumulables) qui entraînent de nombreuses altérations des systèmes biologiques, l'utilisation de ces agents blanchissants est interdite dans divers États développés. Les enzymes sont une bonne alternative aux agents blanchissants chlorés. L'utilisation de xylanases dans l'étape de blanchiment de la pâte kraft permet d'éviter le chlore et de réduire les déchets toxiques, d'éliminer l'étape du goulot de bouteille (en raison de la capacité limitée des cuves de dioxyde de chlore), d'augmenter le degré de blanc de la pâte et de diminuer les coûts de l'opération, notamment dans les usines qui utilisent de grandes quantités de dioxyde de chlore. Enfin, le prétraitement aux enzymes permet également d'augmenter le degré de blanc final de la pâte et de réduire la présence des agents chimiques dans l'étape du blanchiment. Le désencrage est une étape nécessaire si l'on souhaite utiliser comme matières premières des fibres récupérées dans la fabrication de papier et de carton ; la réutilisation de ces fibres dépend de l'élimination des encres et des autres polluants. Le désencrage présente néanmoins des inconvénients, notamment dans le cas du papier recyclé et produit de nouveaux déchets solides et liquides. Voici les enzymes utilisées dans les étapes du désencrage : les lipases, les estérases, les pectinases, les hemicellulases, les cellulases et les enzymes lignitiques. Les deux premières, les lipases et les estérases, dégradent les encres à base d'huiles végétales. Les autres (les pectinases, les hemicellulases, les cellulases et les enzymes lignitiques), modifient la surface de la fibre de cellulose ou les unions proches des particules d'encre, ce qui libère la teinture de la fibre et permet de la séparer par flottation ou lavage.

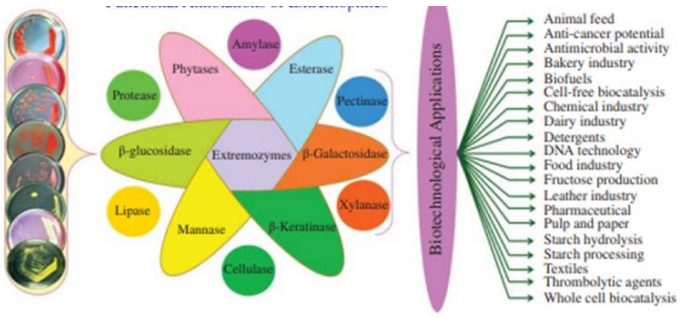


Figure 9: Les enzymes hydroluptiques et leur application biotechnologique dans l'alimentation et les secteurs

3. Applications industrielles futures

Un certain nombre d'enzymes ont fait l'objet de nombreux travaux et leurs utilisations en technologie alimentaire en sont au stade pilote ou préindustriel. Eu égard aux substrats employés, ces activités enzymatiques peuvent être déstructurantes, structurantes ou synthétisantes de molécules bio- ou technofonctionnelles, activités déstructurantes à l'image des applications industrielles confirmées, il s'agit de nouvelles enzymes de la famille des hydrolases qui assurent la déstructuration de macromolécules. La rhamnogalacturonase a pour substrat préférentiel la zone ramifiée riche en rhamnose des pectines qui est la fraction du matériel pariétal résistant à la dégradation par des enzymes pectinolytiques, hémicellulolytiques et cellulolytiques. Cette enzyme n'est active que sur le substrat dont les unités galacturoniques sont déméthoxylées et déacétylées. Dégradant les fractions pectiques résiduelles des jus de fruits ou de légumes, elle permet une meilleure filtrabilité des moûts. Dans la même filière industrielle, les protopectinases sont également intéressantes pour favoriser la liquéfaction de tissus. Ces enzymes catalysent en effet la solubilisation de pectines de masse moléculaire élevée à partir de protopectine . Nota : la protopectine est définie comme la fraction de pectine qui ne peut être extraite de la paroi par l'eau, les tampons ou les chélateurs d'ions divalents. Chaque constituant de la protopectine est susceptible d'être dégradé par une protopectinase spécifique. Ainsi, les enzymes de type A agissent sur les zones homogalacturoniques, celles de type B ont une activité sur les chaînes latérales ou la zone rhamnogalacturonique. En résumé, ces enzymes présentent une activité endogalacturonase mais elles diffèrent de ces dernières par leur activité beaucoup plus importante sur les substrats insolubles que sur le pectate solubilisé. De même, parmi les enzymes déstructurantes aux nombreuses applications industrielles potentielles, citons

les alginases. Qu'elles dépolymérisent l'alginate (polymères linéaires constitués d'acides uroniques) par une réaction de b-élimination. Ces biocatalyseurs pourraient donc servir pour l'élimination d'alginates ou pour la fabrication d'extraits, ou encore pour la production d'oligosaccharides. Enfin, dans ce paragraphe sur les activités enzymatiques déstructurantes, la mention des études entreprises depuis maintenant de nombreuses années sur l'extraction des huiles assistée par les enzymes (cellulases, hémicellulases, pectinases, protéases, amylases...) s'impose. Cette nouvelle stratégie en huilerie présente de nombreux avantages socio-économiques (qualité des produits finaux, coût de revient, respect de l'environnement...) mais, à notre connaissance, les conditions expérimentales n'ont été pour l'heure optimisées qu'au stade du laboratoire pour des matières premières comme la noix de coco.

Les applications des lipases - tout comme d'autres hydrolases - sont également envisagées dans la synthèse de nouvelles molécules par inversion de leur activité naturelle. Cela nous conduit naturellement à évoquer les activités synthétisantes.

Chapitre II : Matériels et méthodes

I. Matériel

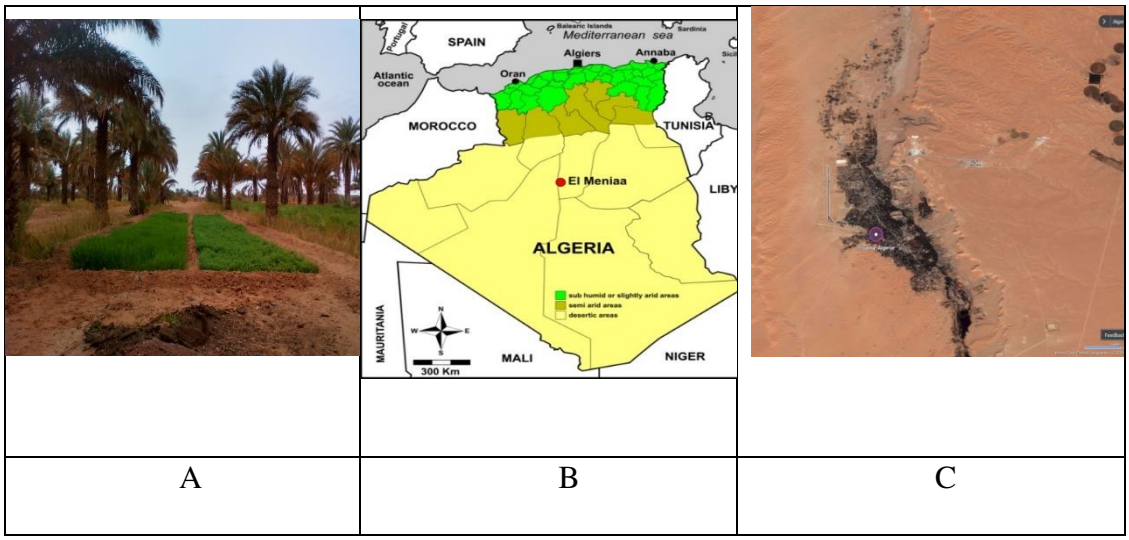
1. Matériel non biologique

Durant notre stage de fin d'étude réalisé au niveau du laboratoire pédagogie de la faculté des sciences-Université Yahia Fares –Médéa- durant la période Février –Juin 2022. Pendant ce stage pratique nous avons utilisés des appareils (Annexe 1), des solutions (Annexe 2) et des milieux de culture (Annexe 3).

2. Matériel biologique

2.1. Bactéries appartenant au genre Bacillus

Les bactéries utilisées dans cette étude ont été isolés à partir d'un sol rhizosphérique associé aux plantules d'orge commun (*Hordeumvulgare* L.) (Figure.a) cultivées au niveau de la station expérimentale (Figure.b) de l'université des Sciences et de la technologie, Houari Boumedienne, El Menia(30°37'00.8"N, 2°52'47.0"E) (Figure.c) durant la période Janvier-Mars 2022.



A	B	C

Figure 10: Localisation géographique de la wilaya d'El Menia (a) et vue satellitaire de la station de recherche expérimentale de l'université des sciences et de la technologie – USTHB-(b) et les zones de prélèvement du sol au niveau de la station (c).

Les isolats ont été obtenus après un isolement sur milieu de culture TSA (Tryptose Soja Agar). Après une purification par une série de repiquage successif sur le milieu milieu, une conservation dans le glycerol 40% a été réalisé à une température de -20°C. Les isolats ont été nommés par le code BRO, qui signifie Bacillus Rhizosphère Orge, suivi par un numéro.

Pour la sélection des bactéries appartenant au genre Bacillus uniquement, un prétraitement thermique a été réalisé, afin de sélectionner la flore sporulée et d'éliminer toutes les formes végétatives (Vinter, 1987). Les isolats ont été ensemencés dans des tubes à essai contenant 20ml du milieu TSB puits incubés à 25°C sous agitation (150 rpm) pendant 24h. Après l'incubation, un chauffage dans un bain marie à 80°C pendant une heure a été réalisé suivi d'un ensemencement par stries sur le milieu TSA et une incubation à 25°C pendant 24 à 48h.

L'appartenance des bactéries sélectionnées après le traitement thermique au genre Bacillus a été confirmée par quatre tests préliminaires (Figure 11) qui sont suffisants selon Gordon et *al.,* (1973) et Claus et Berkely, (1986) :

-La réaction positive à la coloration de Gram.
- La visualisation de l'endospore par observation microscopique, grâce à sa réfringence à la lumière.

-La mobilité à l'état frais ou avec sur le milieu mannitol mobilité.
- La catalase positive.

Pour cette étude nous avons utilisé 53 isolats

Résultat positive de la coloration Gram (A). Test mobilité sur milieu mannitol-mobilité (B). Réaction positive pour le test catalase (C).

II. Méthodes

1. Revivification des isolats

La revivification des isolats a été réalisée sur milieu de culture liquide TSB et mis à une incubation pendant 48h à 25°C sous agitation (150rpm). Après formation du

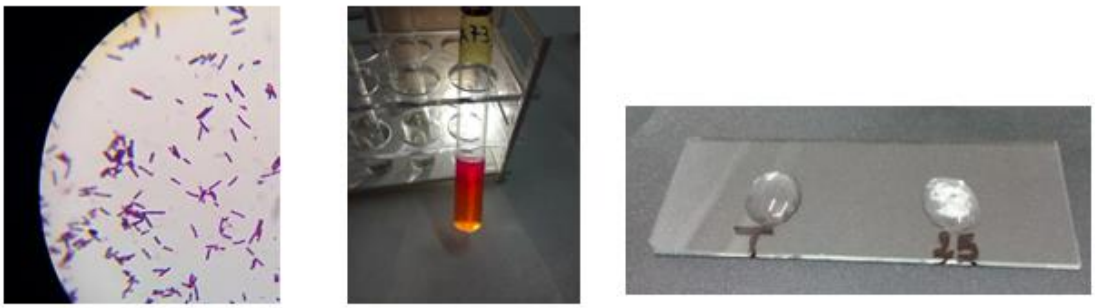


Figure 11: Résultats des tests de sélection des isolats comme étant appartenant au genre Bacillus.

trouble, un ensemencement par stries a été réalisé sur TSA et puis incubé pendant 48h à 25°C. Une copie des isolats a été conservé dans le glycérol 40% à -20°C.

2. Criblage de l'activité enzymatique

Les différentes activités enzymatiques des 53 isolats retenus ont été mises en évidence par l'utilisation des milieux spécifiques contenant le substrat à dégrader. (Ariffin et*al.,*2006).

2.1. Lipase

Les lipases sont largement répandues au sein de la plante bien qu'on les retrouve principalement dans les graines où les triglycérides et qui sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes (ou *oil bodies*) (Beisson et al., 2001). Sous l'action des lipases, ces triglycérides sont hydrolysés sous forme d'acides gras dont le rôle est de fournir l'énergie nécessaire à la germination de la graine et au développement de la jeune plante (Adlercreutz et al., 1997).

La production des lipases par nos isolats a été testée sur le milieu de culture décrit par Sierra (1957) qui contient le Tween 80 (1%, v/v) comme source de lipide et qui est ajouté pour révéler l'activité estérasique. Le pH est ajusté à 7,4 (Carrim et *al.,* 2006). Après ensemencement en spot, les boites ont été incubées à 30C° pendant 48h. La présence d'une activité est traduite par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

2.2. Protéase

Les protéases jouent un rôle significatif dans la minéralisation de l'azote dans le sol. C'est un processus important dans la disponibilité de l'azote et donc dans la croissance des plantes. (Petit et Jobin, 2005 ; Nannipieri et *al*., 2011). Ils jouent également un rôle important dans la lyse de la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes (Elad et Kapat ,1999).

La révélation de l'activité protéasique des isolats a été déterminée par ensemencement par spot des bactéries sur un milieu de culture additionné de lait écrémé. Après 48 h d'incubation à 28°C, l'apparition d'un halo transparent autour des colonies reflète la présence d'une activité hydrolytique protéolytique (Bach et Munch, 2000).

2.3. Cellulase

Les cellulases sont des enzymes inductibles synthétisées par une grande diversité de microorganismes comprenant les champignons et les bactéries pendant leur croissance sur les matériaux cellulosiques, ces enzymes ont constituent une cible pour les recherches académiques aussi bien industrielles (Sukumaran et *al*., 2005).

Pour révéler l'activité cellulasique, des boites contenant un milieu de Carder additionner de CMC (carboxy-méthyl cellulose, un dérivé de cellulose soluble, dégradable) comme seule source de carbone (Johnsen et Krause, 2014) a été ensemencées par spot puis incubées pendant 4 jours à 30°C (Carrim et *al*., 2006). Après l'incubation, une solution aqueuse de rouge Congo (1%) a été ajoutée à la surface des colonies. Après 20 minutes, la surface est inondée avec 1M de NaCl puis conservée une nuit à 5°C. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'un halo clair entourant les colonies bactériennes.

2.4. Uréase

L'uréase est une enzyme responsable de l'hydrolyse de l'urée pour produire le CO_2 et l'ammoniac (NH_3), ce qui augmente la disponibilité de l'azote pour les plantes (Byrnes et Amberger, 1989 ; Van et Wang, 1991). Elle est utilisée comme indicateur de la qualité du sol, car sa concentration est en fonction du taux de la matière organique (Martinez-Salgado et *al*., 2010).

Afin de vérifier la présence de l'uréase chez nos souches, nous avons préparé un milieu à base de peptone et d'un volume de 950 ml (Annexe 1), le milieu a été ajusté à pH 6,8. Après autoclavage, 50 ml d'une solution d'urée à 40%, préalablement stérilisée par filtration (0.22 µm), a été ajoutée. Après ensemencement par spot de nos isolats l'activité uréasique est traduite par la présence d'un halo rose autour des colonies (Christensen, 1946).

2.5. Gélatinase

Le test gélatinase a été effectué pour déterminer la capacité des micro-organismes à produire l'enzyme gélatinase (Aneja, 2003). Les cultures en croissance active (âgées de 18 à 24 h) ont été inoculées par piqure centrale dans des tubes contenant un milieu à base de gélatine puis incubées à 25°C pendant 15 jours. Après incubation les tubes ont été placés dans un bain de glace ou un réfrigérateur (4 ° C) pendant 15-30 minutes, les

cultures qui produisent de la gélatinase restent liquéfiées tandis que d'autres en raison de la présence de gélatine deviennent solides.

2.6. Phosphatase

La solubilisation de phosphate inorganique a été déterminée sur le milieu NBRIP (National Botanicalb Research Institut's Phosphate), contenant 0,5% du phosphate tricalcique ($Ca_3(PO_4)_2$) comme seule source de phosphate insoluble (Nautiyal, 1999).

Les isolats bactériens fraîches et âgées de 24h, ont été ensemencées par spot sur la surface du milieu NBRIP à raison de cinq souches par boîte de Petri, puis incubées à 30 °C pendent 14 j. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Sagervanshi**,** 2012).

L'estimation de l'activité de solubilisation a été déterminé par le calcul de l'indice de solubilisation (ISP) calculé selon la formule suivante (Sitepu et *al.,* 2007) :

$$\mathbf{SI} = \frac{\text{Diamètre de la colonie + Diamètre de la zone claire}}{\text{Diamètre de la colonie}}$$

2.7. Nitrate réductase

Le test a été effectué pour déterminer la capacité des micro-organismes à produire l'enzyme nitrate réductase. Les cultures en croissance active (âgées de 18 à 24 h) ont été inoculées par piqure centrale dans des tubes contenant un milieu mannitol mobilité nitrate puis incubées à 30°C pendant 24 h , un résultat positif se traduit par un virage de couleur de milieu de culture.

2.8. Pectinase

Pour la mise en évidence des bactéries à produire la pectinase , un test sur un milieu gélosé à base de pectine à été réalisé. Les isolats bactériennes fraîches et âgées de 24h, ont été ensemencées par spot puis incubées à 30 °C pendent 48 h . Un résultat positif se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Stratilova et al., 1993).

2.9. Lécithinase et la lipoprotéinase

Le milieu à base de jaune d'œuf est un milieu complexe qui contient des phospholipides, plus particulièrement la phosphatidyle-coline (ou lécithine), des

triglycérides et des lipoprotéines. Bien qu'il soit expressément pour la mise en évidence de la lécithinase, il permet aussi une appréciation de et la lipoprotéinase (Marchal et al 1982). Les isolats bactériens fraîches et âgées de 24h ont été ensemencées par spot et incubées à 30°C pendant 24 à 48 h.

2.10. Amylase

L'amylase est l'enzyme qui a la capacité d'hydrolyser l'amidon. La synthèse des enzymes amylasiques par les bactéries permet une dégradation de la matière organique dans la nature et fournir des éléments minéraux que les plantes vont utiliser pour leur croissance (Raj et *al*., 2009).

La recherche de la présence de l'enzyme amylase chez nos isolats a été détectée sur milieu solide TSA additionnée d'amidon à 1%. Après un ensemencement des isolats par spot, les boites ont été incubées à 25°C pendant 5 jours. La révélation se fait par l'inondation des boites par une solution iodée (Lugol). L'hydrolyse de l'amidon se traduit par un halo clair autour de la colonie, contrairement aux zones contenant de l'amidon qui se colorent en bleu (Delarras, 2014). Le diamètre du halo d'hydrolyse est obtenu en soustrayant le diamètre de la colonie de celui diamètre total pour chaque isolat.

3. Influence des paramètres physico-chimique sur la production d'amylase

La capacité de production d'amylase par les meilleurs isolats qui ont montré une forte activité enzymatique a été évaluée sur le milieu solide TSA additionnée d'amidon à 1%, sous l'effet de diverses conditions physico-chimiques. Il s'agit de la température, le pH, la salinité et la quantité d'amidon dans le milieu de culture.

3.1. Effet de la température

L'évaluation de l'effet de la température sur l'activité amylasique a été effectuée après ensemencement de nos isolats par spot suivi par une incubation des boites à différentes température : 25°C, 30°C, et 40°C pendant 4J. L'évaluation de l'effet de la température sur la production d'amylase a été évaluée par mesure du diamètre de le halo d'hydrolyse.

3.2. Effet du potentiel hydrogène

L'évaluation de l'effet du potentiel hydrogène (pH) sur l'activité amylasique a été effectuée après ensemencement de nos isolats par spot sur le milieu TSA +1% Amidon de différents pH (5, 7,8 et 10) suivi par incubation à 30°C pendant 4J. L'évaluation de

l'effet du pH sur la production d'amylase a été évaluée par mesure du diamètre de l'halo d'hydrolyse.

3.3. Effet de la salinité

L'évaluation de l'effet de la salinité sur l'activité amylasique a été effectuée après ensemencement de nos isolats par spot sur le milieu TSA +1% Amidon de différents niveaux de NaCl (50. 100. 150. 200.250mM) suivi par incubation à 30°C pendant 4J. L'évaluation de l'effet de la salinité sur la production d'amylase a été évaluée par mesure du diamètre de le halo d'hydrolyse.

3.4. Effet de la quantité d'amidon

Pour ce paramètre les souches ont été ensemencées dans des milieux de culture TSA à (1 % , 0.5 % et 0.25 %) d'amidon puis incubés à 30 °C .

L'évaluation de l'effet de la salinité sur l'activité amylasique a été effectuée après ensemencement de nos isolats par spot sur le milieu TSA additionné de différentes quantités d'Amidon (10g. 5g. 2,5g) suivi par incubation à 30°C pendant 4J. L'évaluation de l'effet de la quantité d'amidon additionnée au milieu TSA sur la production d'amylase a été évaluée par mesure du diamètre de le halo d'hydrolyse.

4. Evaluation quantitative sur la production d'amylase

L'évaluation quantitative de la production de l'amylase par nos isolats a été effectuée par la méthode spectrophotométrique.

Des suspensions bactériennes à base des différents isolats ont été préparé sur milieu TSB et laissé à incuber pendant 24h à 25°C sous agitation (150rpm). Dans des tubes à essai contenant 10 ml du milieu TSB additionné de 1% d'amidon ont été inoculé avec 1 ml de la suspension bactérienne. L'ensemble a été incubé sous agitation (150rpm) pendant 4J.

Les bouillons de culture ont été centrifugés à 8 000 rpm à 4 °C pendant 10 min et l'évaluation de l'activité de l'amylase a été réalisée suite à une détermination de la quantité du glucose produite suite à la dégradation de l'amidon sous l'effet de l'amylase. La production du glucose a été estimée à l'aide de la méthode phénol-acide sulfurique (Godinho, 2009).

Cette détermination a été réalisée après une mesure de la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 487 nm.

4.1 Dosage de glucose

Le dosage des sucres hydrosolubles abstenus après dégradation de l'amidon sous l'effet de l'alpha amylase a été réalisé sur la méthode de Dubois et al al., (1956) .

Après incubation à 30°C pendant 4 jours, Les suspensions bactériennes ont été centrifugé à 10000rpm pendant xx min puis 1 ml a été prélevé et ajouté à 1 ml de la solution de phénol et 5 ml d'acide sulfurique. L'ajout d'acide sulfurique constitue une étape clé dans cette manipulation. Il doit se faire très rapidement puisque la réaction qui se produit entre le phénol et l'acide sulfurique est quasi-instantanée (Herbert., PhippsStrange.,1971) idéalement l'ajout de l'acide sulfurique dans chaque tube devrait se faire au même temps. Après une agitation au vortex L'ensemble a été incubé au bain marie à 30 °C pendant 30 minutes et placé 30 min à l'obscurité.

L'absorbance a été mesuré à une longueur d'onde de 487 nm. Les valeurs obtenues sont traduites en concentration de glucose par référence à une courbe d'étalonnage.

Une courbe étalon est tracé à l'aide de concentrations croissantes en glucose préparées à partir d'une solution mère de 10µg/ml, pour connaitre la correspondance entre les D O et les concentrations en glucose : y = 0.1493x. Ainsi, D.O = 0.1493 * [C] -> [C] = D.O / 0.1493.

5. Extraction et purification de l'amylase

5.1. Préparation de l'extrait de culture

A partir d'une préculture de 10 ml de la souche productrice, 100 ml de TSB d'amidon 1 % ont été ensemencé et incubé à 30 °C pendant 4 jours.

Les cellules bactériennes ont été éliminées par centrifugation à 8000 rpm pendant 20 min à 4°C. Le surnageant obtenu a été filtré sur une membrane de porosité de 0.45µm. (young C et all,. 1995)

Le pH du filtrat obtenu a été ajusté à 5.5-6.5 avec une solution de NaOH 1M. La solution obtenue a été nommé « Fraction A » dont l'activité antagoniste a été quantifiée par le test de la dilution critique et le test de diffusion. (Young et al,. 1995)

5.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

La précipitation est une méthode à la fois de purification et de concentration des bactériocines basées sur les précipitations par les sels minéraux

Le sulfate d'ammonium 80% a été ajouté progressivement à la fraction A à 4°C et sous agitation douce. Après précipitation, le surnageant a été laissé sous agitation très douce à 4°C pendant une nuit. (young C et all,. 1995)

5.3. Dialyse

La fraction protéique a été récupérée par centrifugation à 9000 rpm pendant 20 min à 4°C. Le culot obtenu a été resuspendu dans un minimum de tampon phosphate (PB10mM,pH7).

La solution a été ensuite dialysée pendant une nuit dans un sac à dialyse, dont la coupure de la masse molaire est de 1000Da, contre 5L de tampon phosphate. Par la suite, les sacs de dialyse ont été trempés dans la poudre de polyéthylène glycol PEG 4000 pour concentrer l'échantillon éventuellement dilué par le phénomène de dialyse (Estelle et al,. 1997) .

6. Identification phénotypique

6.1. Etude macroscopique

Les colonies obtenues sur milieu solide ont été observées à l'œil nu. L'étude macroscopique permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification, elle est basée sur les éléments d'identification donnés par Joffin et Leyral (2006):la forme, la taille, l'opacité, l'élévation et l'aspect de contour et de surface.

6.2. Etude microscopique

L'observation microscopique a été réalisée à l'état frais et fixée**.**

- **Examen à l'état frais**

L'observation à l'état frais permet d'explorer la mobilité des cellules bactériennes et le mode de groupement et de faire une approche de leur morphologie (Bousseboua, 2002).

Une petite goutte d'eau physiologique stérile a été déposée au centre d'une lame stérile, puis une partie d'une colonie bactérienne pure en phase de croissance (24 h) a été prélevée par l'anse flambée et dissociée dans la goutte, une lamelle stérile a été ensuite appliquée sur la goutte en évitant la formation des bulles d'air. L'observation microscopique a été réalisée à l'objectif X40 puis X100 (Joffin et Leyral, 2005).

- **Examen à l'état fixé -Coloration de Gram-**

La coloration de Gram est une coloration différentielle de base permet de distinguer deux grands groupes bactériens en fonction de la composition de leurs parois et de leurs affinités aux différents colorants : des bactéries à Gram positifs colorées en violette et Gram à négatifs en rose, et elle permet aussi de déterminer la forme, la taille, l'arrangement, la nature biochimique de la paroi des cellules bactériennes, la vérification de la pureté de l'isolat et de visualiser et permet de visualiser les endospores bactériennes leurs formes et leurs positionnements.

La coloration de Gram a été réalisée selon la méthode de Hans Christian Gram (1884).

A partir des souches jeunes et pures, un frottis fixé à la chaleur a été réalisé puis recouvert par le violet de Gentiane pendant une minute, il a été ensuite rincé à l'eau distillée et traité pendant une minute par une solution de Lugol, et de nouveau rincé à l'eau distillée. Le frottis a été ensuite décoloré avec de l'éthanol 95% pendant 15 à 30 secondes, à ce stade, les cellules Gram négatives seront incolores et les cellules Gram positives violettes, puis rincé à l'eau distillée. Ensuite, une contre coloration de 30 secondes à la fuchsine a été réalisée pour colorer les cellules Gram négative présentes. Après un bref rinçage, le frottis a été séché au buvard ou au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen, puis examiné sous microscope optique aux grossissements X40 et X100 après l'ajout de l'huile à immersion.

6.3. Caractérisation biochimique

Pour la caractérisation biochimique des isolats, plusieurs tests ont été effectués. Il s'agissait des tests de la catalase, de l'oxydase et de la mobilité et le type respiratoire.

6.3.1. Le test de catalase

La catalase est une enzyme antioxydante présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. Elle empêche l'accumulation de l'eau

oxygénée (H_2O_2) dans la cellule bactérienne dont l'action serait létale. Elle décompose l'eau oxygénée en eau et en oxygène selon la réaction : $H_2O_2 \rightarrow H_2O + ½ O_2$.

Le test consiste à déposer sur une lame propre et sèche une goutte d'eau oxygénée, dans laquelle un petit prélèvement d'une colonie bactérienne jeune a été dissocié à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. Un résultat positif se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O_2) (Meyer et*al.*, 2004).

6.3.2. Test oxydase

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme (phényléne diamine oxydase) présente dans certaines chaines respiratoires cytochromiques bactériennes.

Le test consiste à mettre sur une boite de Pétri, un disque pré-imprégné d'un réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) et l'imbiber avec de l'eau physiologique stérile, ensuite une colonie jeune et pure a été prélevée avec une pipette Pasteur bouclée, et déposée sur le disque. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette après quelques secondes (Joffin et Leyral, 2006).

6.3.3. Test de mobilité

L'étude de la mobilité a été réalisée sur milieu Mannitol-mobilité. Ce milieu permet l'étude de la fermentation du mannitol, la mobilité et la réduction du nitrate (enzyme respiratoire).Le test a été procédé par l'ensemencement de la colonie à l'aide d'une pipette Pasteur, par piqûre centrale, jusqu'au fond du tube de gélose, incubée pendant 24 heures à 30°C.

La fermentation du mannitol est traduite par un virage de la couleur du milieu de culture au jaune

et les bactéries mobiles envahissent le milieu de culture à partir du point d'ensemencement (Bouras, 2018).

6.4. Caractérisation physiologique

L'identification physiologique des isolats a été mise en évidence par l'étude des critères suivants : Tolérance à la température, le pH, la salinité et le stress hydrique.

La tolérance à la température a été réalisé sur des boites de Petri alors que les autres paramètres ont été effectués sur des microplaques de titration à 96 puits.

Pour la préparation de ces plaques 150µl de milieu TSA1/10 semi solide a été déposés dans chacun des puits et additionné de bleu de bromothymol qui est un indicateur de pH pour faciliter la lecture, ensuite les puits ont été ensemencés par piqure central et incubés à 25°C pendant 24h. La lecture a été effectuée par une comparaison à des puits non ensemencés, un virage de la couleur au jaune (souches acidifiantes) ou vers le vert (souches alcalinisantes) signifier la croissance des bactéries mais, dans le cas où il n'y a pas un changement de couleur, les puits ont été observés à l'œil nu pour déceler un trouble ou un développement de petites colonies indicateurs d'une croissance bactérienne qui montre la résistance de la bactérie.

6.4.1. Température

L'évaluation de l'effet de la température sur la croissance des isolats sélectionnés a été effectuée par incubation des souches ensemencée sur milieu TSA 1/10 pendant 48 heures à différentes températures 4°C, 25°C, 30°C et à 40°C.

6.4.2.PH

L'influence du pH sur la croissance des bactéries a été réalisée par une série d'essais sur le milieu TSA 1/10 ajusté par l'addition de HCl 1% et du KOH 1% pour obtenir quatre valeurs de pH 2, 7,10 et 14.

6.4.3. La salinité

L'effet de la concentration en NaCl sur la croissance des souches a été déterminé par la culture sur milieu TSA1/10 semi solide additionnés de NaCl pour avoir différentes concentrations 100mM ,200mM, 300mM, 400mM, 500mM et1M.

6.5. Caractérisation métabolique

6.5.1. Fixation d'azote

Cette activité a été testée sur milieu Jensen. Les souches ont été ensemencés par stries sur la surface gélosée ensuite les boites ont été incubées pendant 24-48H à 25°C, ce milieu étant exempte d'azote la croissance des colonies exprime que ces dernières fixent l'azote moléculaire N2 (Vincent, 1970).

6.5.2. Production de sidérophores

La synthèse des sidérophores a été testés sur milieu au Chrome Azurol Sulfate ou CAS gélosé proposé par Shwyn et Neilands (1987), les isolats ont été ensemencés en spots puis incubées à 25°C pendant 7 jours.

Un résultat positif se traduit par un changement de couleur du bleu à l'orange autour de la colonie productrice de sidérophores. Le changement de couleur est dû au transfert des ions ferriques du CAS vers les sidérophores.

6.5.3. Formation de biofilm

Pour évaluer la capacité de nos souches à former le biofilm, nous avons utilisé technique ensemencement sur milieu de rouge Congo.

La formation de biofilm a été recherchée sur le milieu Rouge Congo. Par ensemencement en stries à la surface d'une boite de gélose Rouge Congo (RCA). La lecture a été faite après 24 heures d'incubation à 37°C (Touati et *al*, 2007).

Les souches productrices de biofilm forment des colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges à surface lisse pour les souches non productrices. Les souches de phénotype variables donnent des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (Nasr et *al,* 2012).

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Criblage de l'activité enzymatique

Le criblage de l'activité enzymatique de nos isolats a été effectué pour dix enzymes à intérêt biotechnologique et qui a été réalisé sur des milieux de culture solide.

1.1 Lipase

La production de lipases est influencée par la nature et la disponibilité de la source de carbone et d'azote. Les lipases peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. En tant qu'hydrolases, elles sont responsables du catabolisme des triglycérides et leurs substrats préférentiels qui sont les acides gras et le glycérol. (Guzmán et al., 2008). Elles sont largement répandues chez les bactéries à Gram positif (Fickers et *al.*, 2008).

L'observation à l'oïl nu de la formation d'un halo autour des colonies ensemencé à la surface du milieu de culture figure 12 a montré que sur nos 53 isolats, 32 isolats ont la capacité de dégrader la source lipidique additionnée au milieu de culture. Les colonies ont été entourées d'un halo opaque dû à la formation de cristaux de sel de calcium.

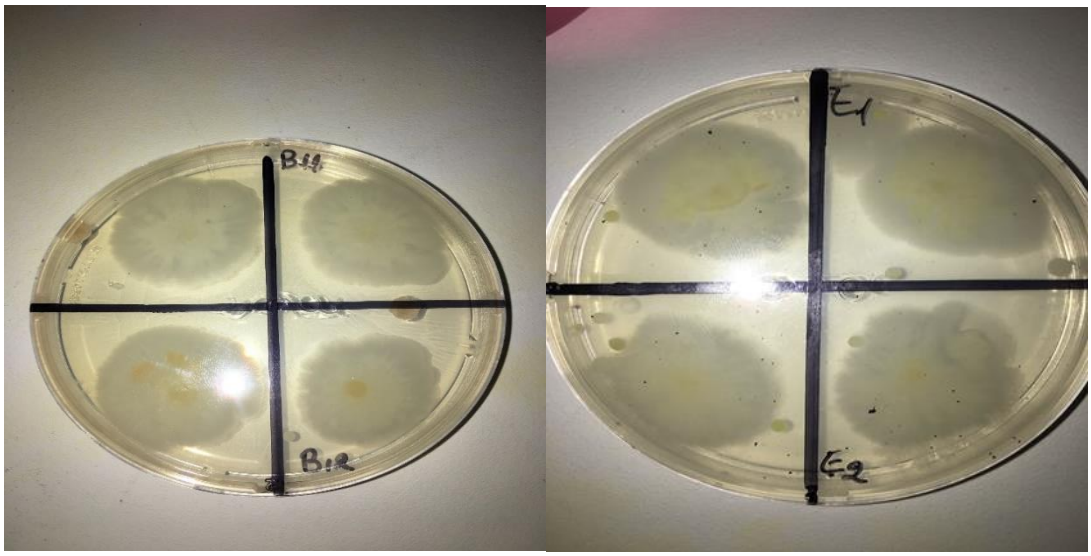


Figure 12: Mise en évidence la production des lipases sur gélose au tween 80.

Nos résultats sont similaires avec les travaux de Azrou et Guettafi (2014) qui ont démontré que la plupart des souches de *Bacillus* isolées à partir d'un sol agricole de la région d'Akbou (wilaya de Bejaïa) peuvent produisent des lipases.

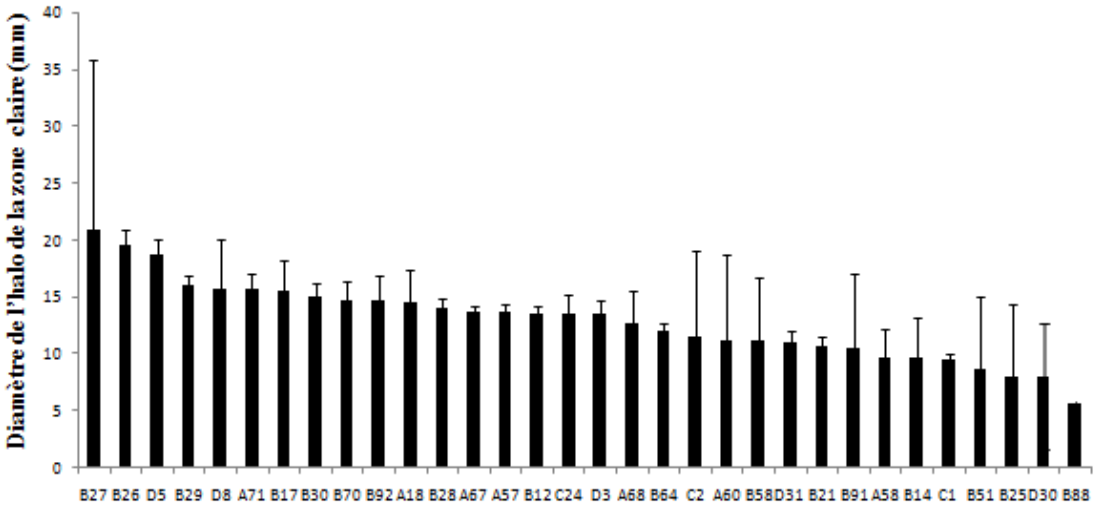


Figure 13: Diamètre de l'halo de la zone claire autour des colonies productrices d'urée.

La comparaison du diamètre du halo de dégradation des 32 isolats nous a permis de les classé en trois groupes : isolats à forte production, les isolats a production modérée et les isolats à faible production (Fig. 13).

9 isolats ont été considérés comme des isolats à forte production, il s'agit des isolats A71. D8. D5. B17. A69. B30. B26. B27. B29 au sein de ce groupe le diamètre de l'halo varie de 15mm à 21 mm. Le second groupe a été représenté par 17 isolats A68. A67. A60. A57. D3. B92. B58. B21. B70. B12. A18. C24. C2. B91. B64. B28. D31 diamètre de l'halo est de 10 à 14 mm, tandis que pour le groupe à faible production des lipases, le diamètre de l'halo est inférieur à 10 mm. Ce groupe renferme 7 isolats il s'agit D30. B25. C1. B88. B51. B14. A58.

Ceci a été souligné par Akanbi*et al.,*(2010) qui ont rapporté que de nombreuses bactéries appartenant au genre de *Bacillus* sont capables de produire une importante quantité d'enzymes lipolytiques.La synthèse des lipases et des estérases par les bactéries testées contribue à la dégradation de la matière grasse et par conséquent, ces bactéries pourraient donc participer au recyclage de la matière organique en fournissant les éléments nécessaires aux plantes. Les lipases sont largement répandues dans la nature

où elles jouent un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses (Fickers et *al.*, 2008).

1.2. Protéase

Les protéases d'origine microbienne sont parmi les enzymes les plus secrétées (Ningthoujam et *al*., 2009). Les souches protéolytiques sont reconnues par la formation des halos translucides au tour des colonies.

L'observation d'une zone claire autour de la colonie indique sa capacité à hydrolyser de la caséine (Protéine du lait). En effet, la majorité de nos isolats A67. A56. A55. D3. B69. B58. B55. B48. B39. B21. B14. B51. D5. B88. C2. C1. B91. B90. B66. B65. B64. B57. B52. B30. B25. B22. B23. B24. B26. B27. B28. B29. D30 ont montré une activité protéolytique (figure 14). Cette observation démontre clairement que, d'une part, les isolats de Bacillus sont capables d'hydrolyser la caséine qui donne des acides aminés solubles utilisables, et d'autre part, que les enzymes responsable de cette hydrolyse sont sécrétées dans le milieu extérieur. Ces résultats permettant de considérer ces isolats comme des bactéries productrices de protéases exocellulaires, ce qui représente un point très positif pour leur production et caractérisation.

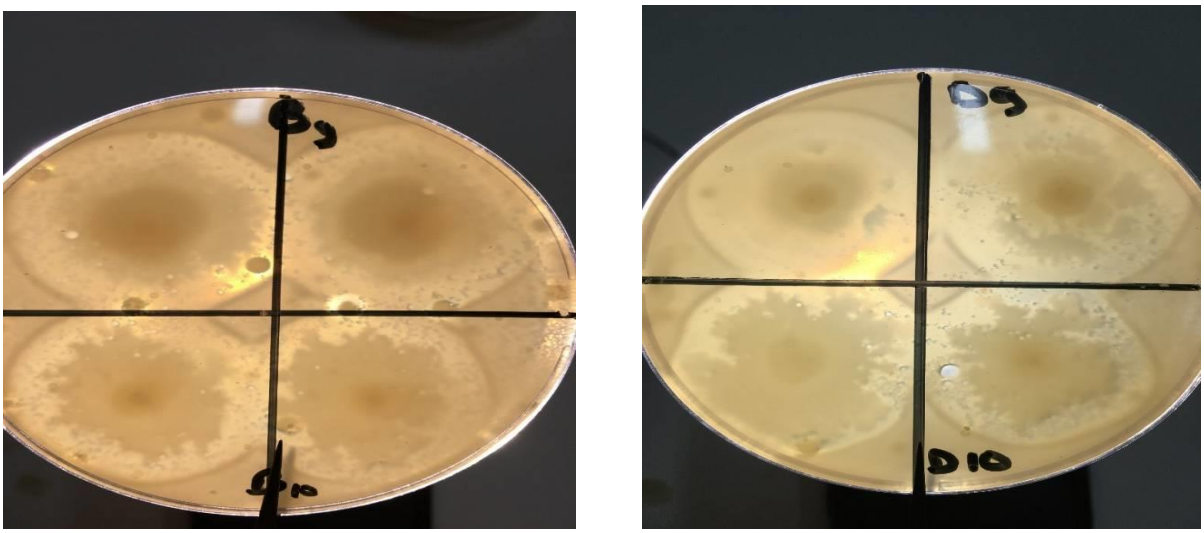


Figure 14: Mise en évidence de la production des protéases sur gélose au lait écrémé

La capacité de nos isolats à hydrolyser les protéines a été déjà confirmé avec les résultats obtenus par Fabiano et *al*., (2017) qui ont constaté que le genre *Bacillus* est probablement la source bactérienne la plus importante de protéases et est capable de produire de hauts rendements en enzymes protéolytiques neutres et alcalins.

Le diamètre de ce halo a été mesuré (figure 15) et a permet de déterminer l'intensité de l'activité. Les isolats D3. B69. B58. B55. B48. B65. D30. B39. B21. B14. B51. B88. C2. C1. B91. B90. B66. B64. B57. B52. B30. B25. B22. B32. B24. B25. B26. B27. B28. B92. ont un diamètre d'halo de 20 mm à 39 mm et de ce fait elles sont considérées comme des fortes productrices, une activité protéolytique plus importante observé chez la souche B28 avec un diamètre d'halo de 38.5 mm . La deuxième classe des faibles producteurs regroupe les isolats A67. A56. A55. D5 avec un diamètre d'halo entre 12 mm à 15 mm . Le diamètre de l'halo est proportionnel soit à la quantité de protéases libérées par les colonies, soit à la diffusion des enzymes secrétées dans le milieu pendant le temps d'incubation.

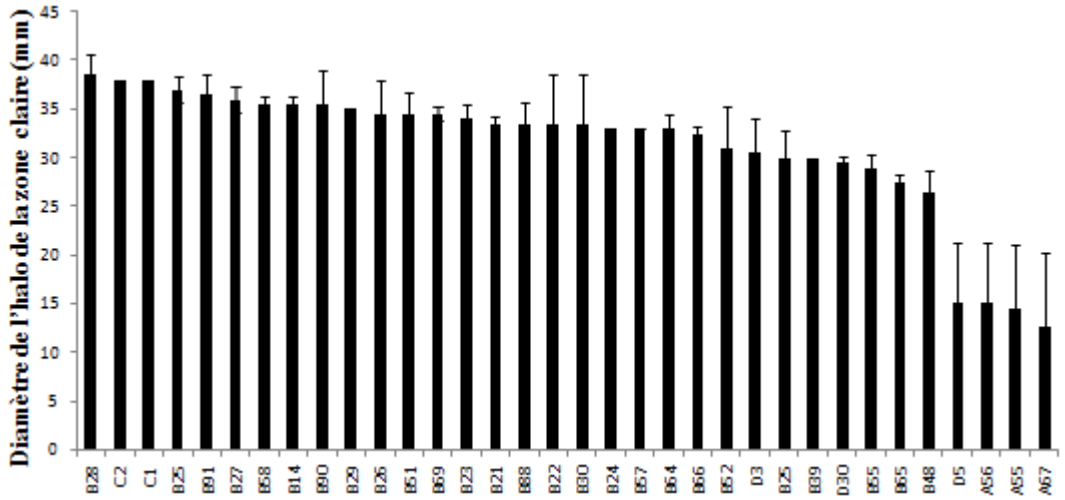


Figure 15: Diamètre de l'halo de la zone claire autour des colonies productrices de protéase.

Les protéases sont les plus employées par rapport aux autres enzymes utilisées en biotechnologie (Antranikian, 2009), elles sont très recherchées dans la bio-industrie et l'agro-alimentaire. Elles représentent environ 65% (50 et 60 milliards d'euros par an) des ventes d'enzymes industrielles dans le marché mondial (Sahoo et al., 2012). Elles sont utilisées comme additives dans : les détergents de blanchisserie, la transformation des produits alimentaires, l'industrie pharmaceutique, la tannerie et dans la gestion des déchets (Amoozegar et al., 2007). En agriculture, l'activité protéasique peut avoir un effet plus poussé, elle influence indirectement la synthèse des auxines en libérant les acides aminés comme le tryptophane qui est le précurseur de la synthèse de l'AIA et d'autres substances appariées (Mansour et *al*., 1994)

1.3. Cellulase

Environ la moitié de carbone est fixée sous forme de cellulose, ce qui fait de la cellulose le composé organique le plus abondant sur Terre (Béguin et Aubert, 1992). Malgré sa faible densité, la cellulose est le matériau organique naturel le plus résistant et le plus stable connu à ce jour. De par sa nature physico-chimique (Bayer et Lamed, 1992), la dégradation de la cellulose joue un rôle clé dans le cycle du carbone (Béguin et Aubert, 1994). Elle est essentiellement convertie par les microorganismes en dioxyde de carbone dans des conditions aérobies et en méthane en anaérobiose (Ljungdahl et Eriksson, 1985).

Dans cette étude l'hydrolyse de cellulose se manifeste par la dégradation de CMC (Carboxy-methyl-cellulose) qui est le composant fondamental de la paroi végétale, traduit par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie après un traitement avec une solution aqueuse de rouge Congo (1%) .

La majeure partie de nos isolats A71. A68. A67. A58. A57. A56. A55. A53. D8. B74. B69. B58. B14. B51. D5. B88. B12. A69. A18. C24. C2. C1. B87. B79. B65. B64. B52. B30. B25. B23. B24. B27. B28. B29. D30 soit 66 % ont montré la capacité de dégradé le CMC (Fig.16). Les colonies apparaissent entourées d'une zone claire avec différents diamètres selon les isolats.

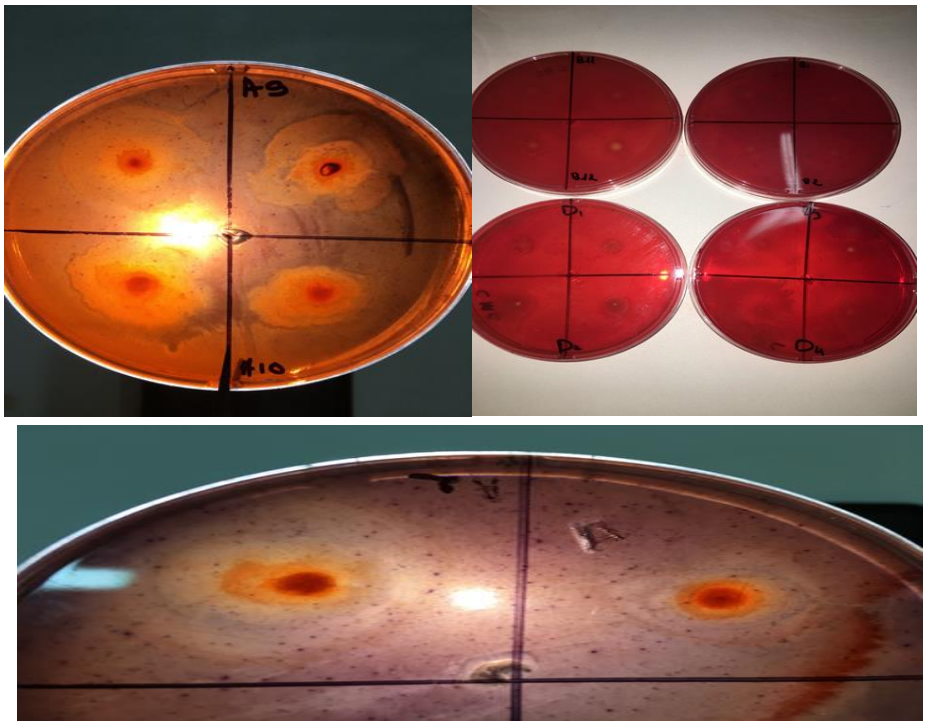


Figure 16: Mise en évidence de la production des cellulases sur milieu carder additionner de CMC.

D'après Maki et *al.* (2011), Plusieurs souches de *Bacillus* produisent les cellulases à 70%. Les résultats obtenus pour cette étude se sont révélés en concordance avec ceux obtenus par Lu et *al*. (2005), ont montré que les espèces de *Bacillus* jouent un rôle important dans la biodégradation et la bioconversion des composés de haut poids moléculaires. Les espèces : *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* sont fréquemment signalées parmi les espèces cellulolytiques.

L'Indice cellulosique « IC » entre le diamètre d'halo et celui de la colonie est proportionnel à la quantité de cellulases extracellulaires secrétées par les bactéries et permet de classer nos isolats à forte, modérée et faible production (Fig.17). Nos résultats nous a permis de classer nos isolats en 3 groupes, en fonction de IC.

50 % des souches ont un IC entre 0.3 et 1 ce sont des isolats à taux de croissance très élevé dite envahissantes. Le deuxième représenté par 9 % soit les isolats A57. B74. C1. B30. B23 ont un IC entre 1.1 et 2 ces derniers ont une production modérée alors que 5 % des souches il s'agit de A71. A68. B29 ont un IC entre 2.1 et 3 sont considérée comme des faibles productrices de cellulase.

Le test de screening solide est assez sensible pour un screening primaire des microorganismes cellulolytiques, mais la taille de la zone d'hydrolyse n'est pas toujours significative de l'activité cellulosique. Une étude a montré que, parmi 77 isolats microbiens cultivés sur milieu CMC, l'isolat à activité enzymatique la plus élevée était celui qui présente la zone claire la moins large (Bettache, 2013).

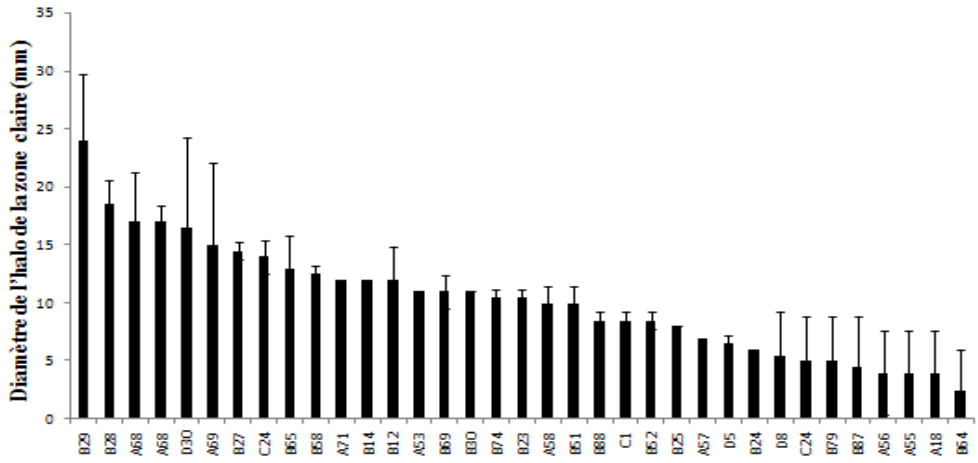


Figure 17: Diamètre de l'halo de la zone claire autour des colonies productrice de cellulase.

1.4. Uréase

L'enzyme uréase catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et carbamate, qui est alors spontanément hydrolysé pour former une molécule d'acide carbonique ainsi qu'une seconde molécule d'ammoniac. L'acide carbonique se dissocie à pH physiologique, et les molécules d'ammoniac s'équilibrent alors avec l'eau pour être protonées, Il en résulte une nette augmentation du pH. Elle est utilisée comme indicateur de la qualité du sol car sa concentration est fonction du taux de la matière organique (Martinez-Salgado et *al*., 2010).

La production d'uréase se manifeste par l'apparition de la couleur rose vif suite à l'alcalinisation du milieu. La recherche de l'activité uréase chez nos isolats a montré que 73 % de nos isolats sont positifs et traduite par la présence d'un halo autour de la colonie bactérienne (Fig.18). Selon Mobley et al ont montré que L'activité uréasique du sol a grande importance car elle module l'absorption d'azote par les plantes après l'application d'urée comme fertilisant (Mobley et al., 1995). En effet L'enzyme uréase est un candidat idéal qui peut être largement utilisé pour explorer les changements dans la fertilité du sol, car l'activité uréase augmente avec l'utilisation d'engrais organiques et diminue avec le travail du sol (Saviozzi et al., 2001). L'activité de l'uréase microbienne diminue également la toxicité des métaux lourds, l'uréase microbienne étant considérée comme un moyen de lutte contre la pollution (Yang et al., 2006).

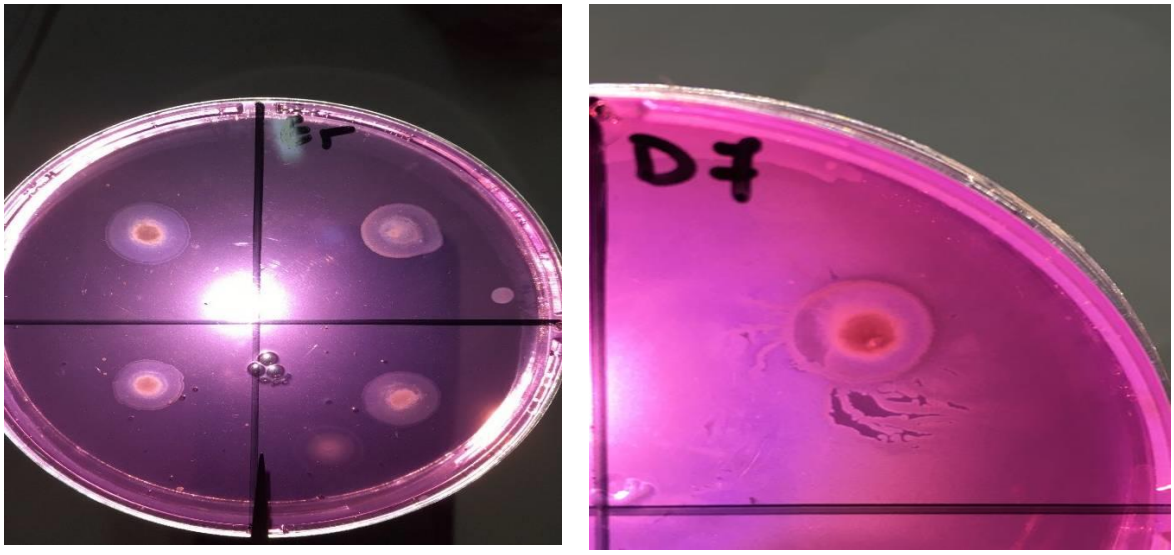


Figure 18: Mise en évidence de la production de l'uréase sur milieu à base de peptone.

Le calcul du diamètre du halo de dégradation (Fig. 19) nous a permis de constater que les isolats A67. A60. A57. A53. D8. D3. B69. B58. B48. B21. D5. B88. B70. B17. B12. A18. B91. B90. B79. B65. B64. B25. B22. B26. B27. B29. D30. D31 ont une forte production de d'uréase par rapport aux autres isolats , le diamètre d'halo entre 9 mm et 13 mm . alors que A55. B92. B74. B55. B14. B51. A69. B57. B30. B23. B24. B25. B28 ont trouvé des souches qui sont une production faible à modérée avec un diamètre d'halo de 5 mm et 8 mm .

Ramesh et Mathivanan (2009) ont obtenu 208 isolats dont *Bacillus sp* productrice de uréase , cellulase, protéase, amylase .

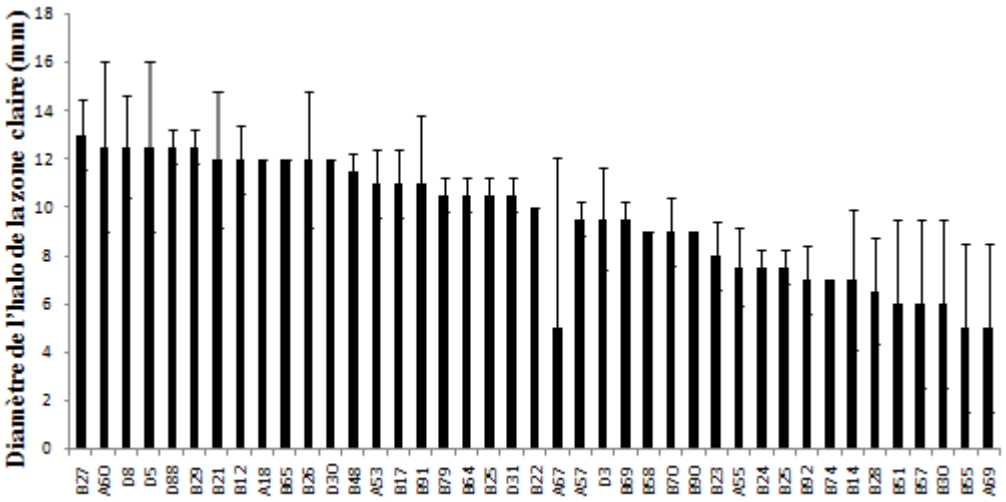


Figure 19: Diamètre de l'halo de la zone claire autour des colonies productrice d'uréase.

1.5. Gélatinase

Le test d'hydrolyse de la gélatine est utilisé pour détecter la capacité d'un organisme à produire de la gélatinase (enzyme protéolytique) liquéfiant de la gélatine. L'hydrolyse de la gélatine indique la présence de gélatinases. Dans la première réaction, les gélatinases dégradent la gélatine en polypeptides. Ensuite les polypeptides sont convertis en acides aminés. Les cellules bactériennes peuvent ensuite absorber ces acides aminés et les utiliser dans leurs processus métaboliques.

Tous nos isolats qui ont été ensemencédans un milieu a base de gélatine sont incapable de dégradé la gélatine (Fig. 20), les milieux restes solide parce que les souches testés sont incapable d'hydrolyser la gélatine. Ces résultats contrastent avec ceux de

Shanmugasundaram., (2012) qui ont monté que B*acillus spp* a produit une activité gélatinase maximale (2,1 U / mL).

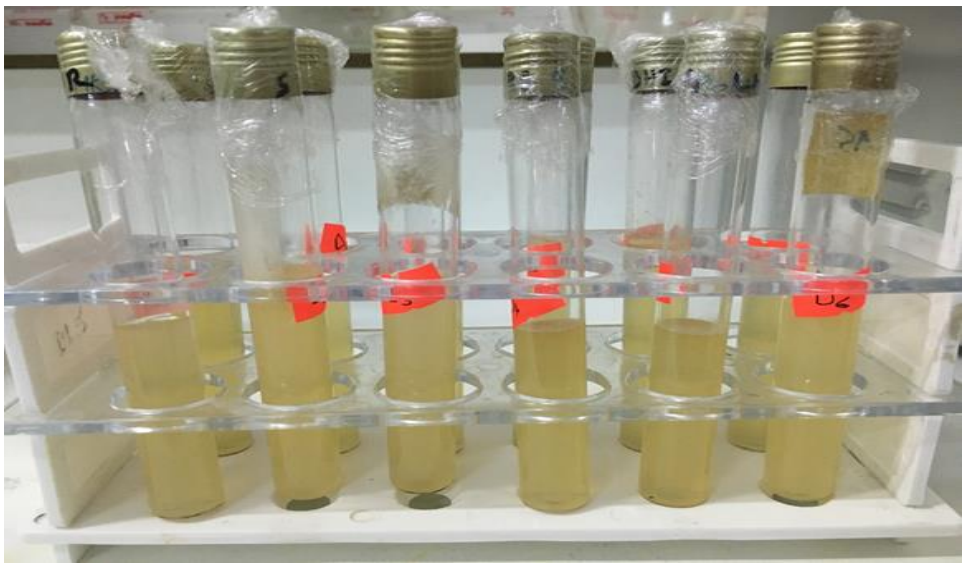


Figure 20: Aspect du milieu à base de gélatine après ensemencement par nos isolats.

1.6. Phosphatase

Le phosphore, avec l'azote et le potassium, fait partie des trois éléments nutritifs majeurs pour la croissance des végétaux. Il est impliqué dans les premiers stades de développement de la plante, joue un rôle primordial dans la croissance racinaire, dans la rigidité des tissus, ou encore dans la formation des inflorescences et des fruits.

Malgré sa teneur relativement importante dans le sol, tout le phosphore n'est pas présent sous une forme assimilable pour les plantes. En effet, les plantes sont uniquement capables d'assimiler le phosphore sous ses formes $H_2PO_4^-$ et HPO_4^{-2} (ions phosphates) (Nautiyal, 1999). La présence du phosphate en faible concentration limite considérablement la croissance des racines, le processus de photosynthèse, la translocation des sucres et la fixation de l'azote par les légumineuses (Olivera et *al*., 2004).

Dans cette étude, 27 de nos souches été capable de solubiliser le phosphate tricalcique sur milieu NBRIP solide. Cette solubilisation est traduite par la présence d'un halo autour de la colonie bactérienne (Fig. 21) .

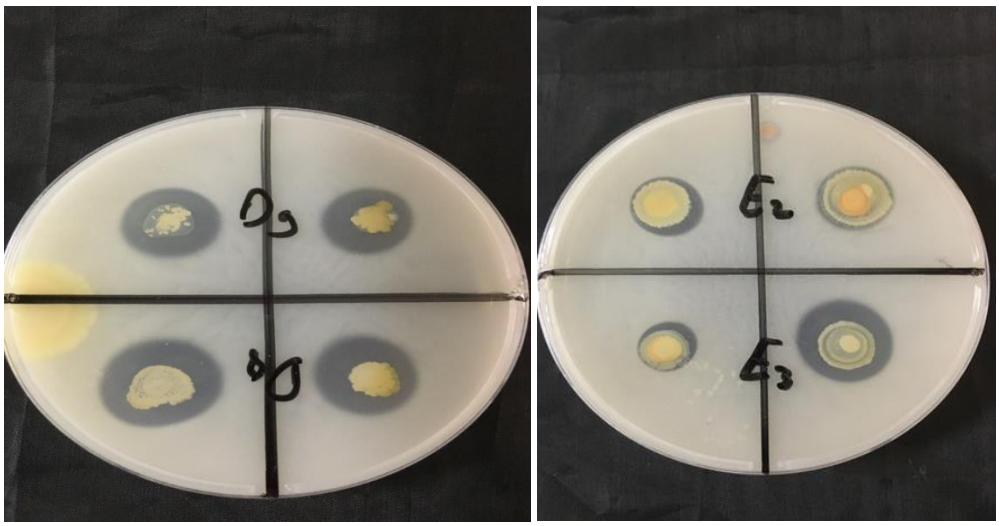


Figure 21: Mise en évidence de la production de phosphatase sur milieu NBRIP.

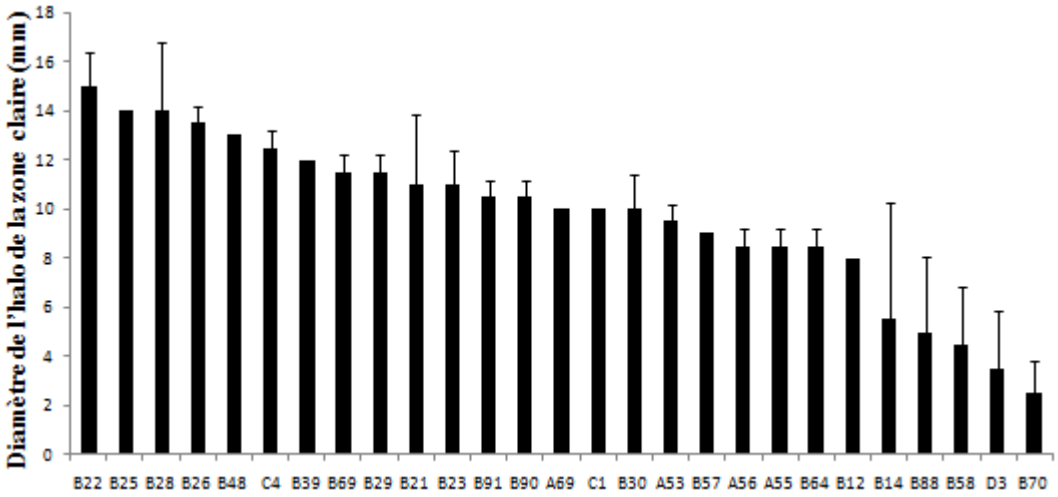


Figure 22: Diamètre de l'halo de la zone claire autour des colonies productrice de phsphatase.

Nos résultats indiquent que seulement 50 % des isolats sont phosphatase positif A56. A55. A53. B14. B88. B69. C1. B64. B57. B30. B1. C4. B69. B48. B39. B21. B12. B90. B91. B22. B23. B25. B26. B28. B29. D3. B58. B70. Ces résultats ont été confirmés par Rodriguez et Fraga (1999) qui ont rapporté que certaines souches de genre *Bacillus sp* solubilisent des phosphates et augmentent la disponibilité du phosphore dans le sol.

Goldstein (2000) a démontré que la capacité de la solubilisation du phosphate et classé en 3 catégories, la première catégorie décrite comme faible (diamètre 0.5-2 mm), la deuxième comme modérée (3-10 mm) et la troisième comme forte (11-21 mm).

La variation du diamètre du halo exprime-elle une variabilité dans le pouvoir de solubilisation du phosphate d'une souche à une autre. 26% de nos isolats ont été considéré comme des isolats à forte production de phosphatase, il s'agit des isolats C4. B69. B48. B39. B21. B12. B90. B91. B22. B23. B25. B26. B28. B29 au sein de ce groupe le diamètre de l'halo varie de 11 mm à 15 mm. Le second groupe a été représenté par les isolats A56. A55. A53. B14. B88. B69. C1. B64. B57. B30. B12 le diamètre de l'halo est de 5 à 10 mm, tandis que pour le groupe à faible production solubilisation de phosphatase le diamètre de l'halo est inférieur à 5 mm. Ce groupe renferme seulement 3 isolats il s'agit de D3. B58. B70.

1.7. Nitrate réductase

La nitrate réductase est l'enzyme qui catalyse la première étape de la réduction du nitrate N en formes organiques dans la plante, et on pense qu'elle reflète le niveau d'activité de N dans les feuilles (Beevers et Hageman, 1969; Lane *et al.* , 1975). en effet une protéine à durée de vie exceptionnellement courte, Sa demi-vie n'est que de quelques heures. Le taux de synthèse *de novo* de cette enzyme est très élevé. Ainsi, en régulant sa synthèse, l'activité de la nitrate réductase dans les tissus peut être altérée en quelques heures (Campbell, 2001) .

Le test effectué sur notre souche est montré qu'aucune isolat n'est capable de produire la nitrate réductase figure 23 , cela se traduit par l'absence d'un virage de couleur de milieu de culture . De ce fait toutes les souches bactériennes étudiées sont dépourvues de la nitrate réductase.



Figure 23: Aspect du milieu de culture après ensemencement par nos isolats

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

1.8. Pectinase

La plupart des préparations commerciales de pectinases sont d'origine microbienne, Les pectinases microbiennes représentent 25% des ventes mondiales d'enzymes alimentaires (Jayani et al., 2005). Dans les industries agroalimentaires, elles sont utilisées en association avec les amylases pour clarifier les jus et réduire ainsi le temps de filtration de 50% (Saxena et al., 2008)

Dans ce travail pour sélectionnées les souches pectinolytiques , l'ensemeble des isolats ont été testé sur un milieu gélosé à base de pectine . Les résultats obtenus après incubation seulement 19 isolats représenté par 35 %, ont été révélées productrice de la pectinase exo-cellulaire donnent des zones d'hydrolyse de diamètres différents suivant la capacité de chaque souche à dégrader le substrat disponible (Fig. 24)

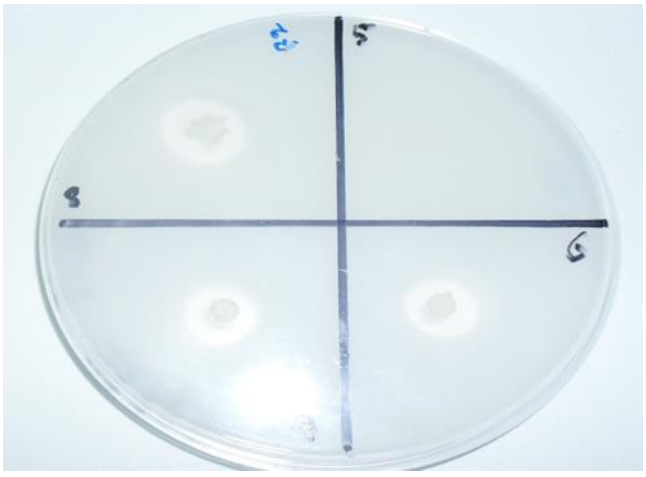


Figure 24: Mise en évidence de la production de phosphatase sur milieu à base de pectine.

Le diamètre de ce halo a été mesuré (figure 25) et a permet de déterminer l'intensité de l'activité, la majorité des isolats ont un diamètre d'halo de 3 mm à 5mm qui sont A57. D3. B58. B48. B39. B14. D5. B91. B87. B79. B23. B24. B29. D31 et de ce fait elles sont considérées comme des faible producteur des pectinase exo-cellulaire .la deuxième classe ont une production modéré regroupes les isolats A71. A67. A60. A58. A55. D30 avec un diamètre d'halo ente 6 mm et 8 mm.

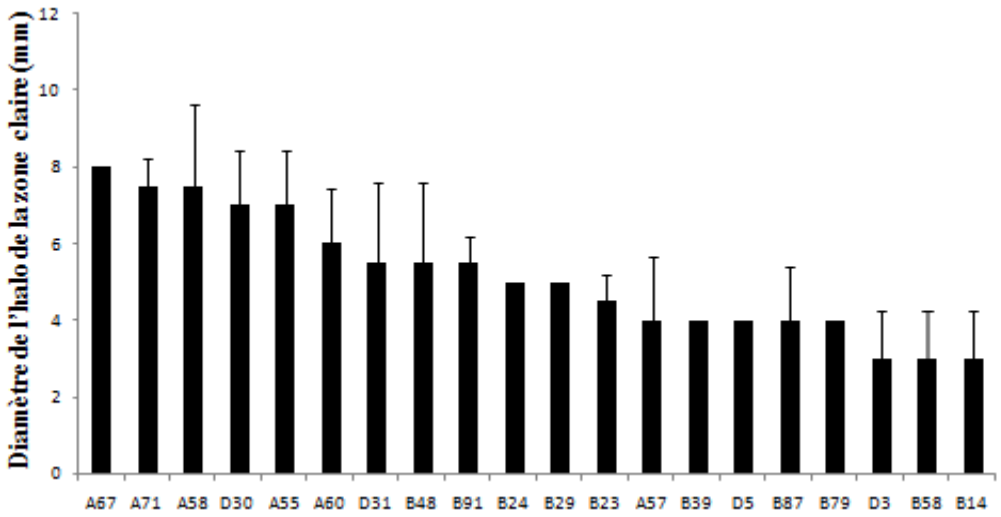


Figure 25: Diamètre de l'halo de la zone claire autour des colonies productrice de pectinase.

Les résultats que nous avons obtenus sont similaires avec les résultats mentionnées par Boulefkhad et talhi .,(2018) qui ont démontré que 20 % des souches de Bacillus isolées à partit d'eau thermale et sol proche des sources thermales capable d'hydrolyser la pectine .

En outre Les résultats des travaux de Azrou et Guettafi N.,(2014) démontré que la plupart des souches de *Bacillus* isolées à partir d'un sol agricole de la région d´Akbou (wilaya de Bejaïa) incapable de produisent des pectinase , De ce fait la majorité des souches de Bacillus étudiée sont dépourvues de la pectinase exo-cellulaire.

1.9.Lécithinase et lipoprotéinase

Les lécithinases ou phospholipases sont des enzymes libérées par des bactéries qui ont la capacité de détruire les tissus animaux et jouent un rôle dans la pathogénicité.

Elles décomposent la lécithine en diglycérides insolubles résultant une zone blanche à crème jaunâtre opaque, et diffuse qui s'étend dans le milieu entourant la colonie. .

Les résultats de criblage de la lécithinase ont montrées que 34 isolats soit 64% caractérisées par une fortes production de cette enzymes, Ces résultats sont traduisent par l'apparition d'une zone d'hydrolyse blanche à crème jaunâtre opaque (Fig. 26) sous l'action de l'enzyme lécithinase sur la lécithine qui libère la choline soluble et un triglycéride peu soluble. Leur précipitation dans le milieu créant une zone opaque crème-jaunâtre à bord net autour de la colonie.

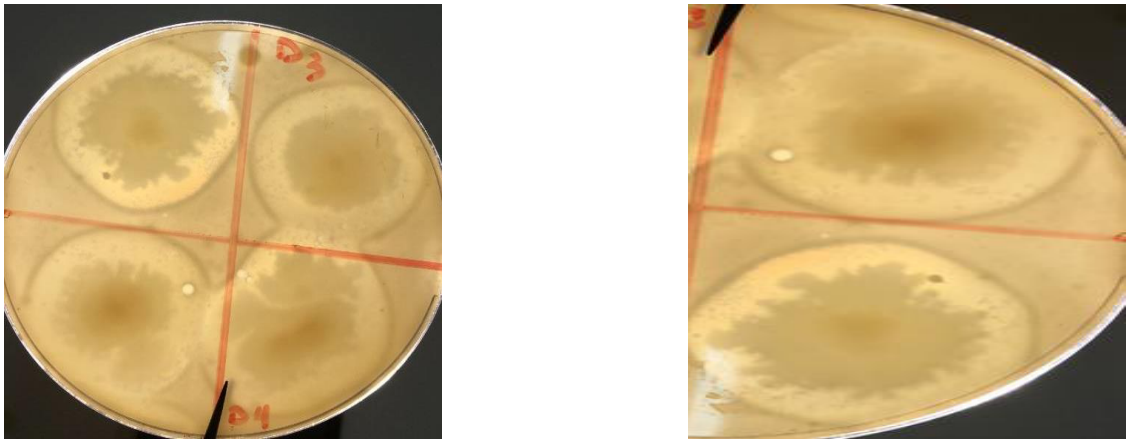


Figure 26: Mise en évidence de la production de lécithinase sur milieu à base de de jaune d'œuf.

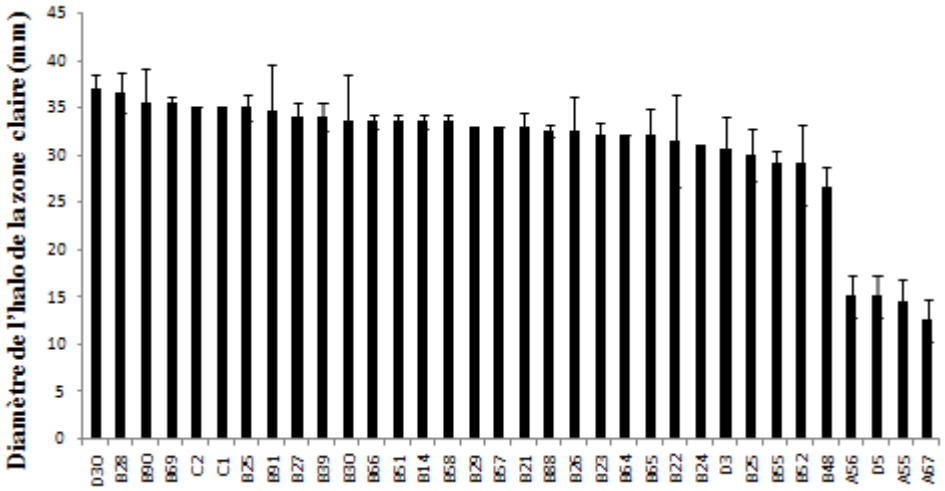


Figure 27: Diamètre de l'halo de la zone claire autour des colonies productrice de lécithinase.

Le calcule de diamètre d'halo (Fig. 27) a montré que 30 isolats ont été considéré comme des isolats à forte production, il s'agit des isolats D3. B69. B58. B55. B48. B39.

B21. B14. B51. B88. C2. C1. B91. B90. B66. B65. B64. B57. B52. B30. B25. B22. B23. B24. B25. B26. B27. B28. B29. D30 au sein de ce groupe le diamètre de l'halo varie de 26 mm à 37 mm. Le second groupe a été représenté par 4 isolats A56. A55. D5. A67 le diamètre de l'halo est de 12 à 15 mm, ces isolat ont une production modérée de l'enzyme.

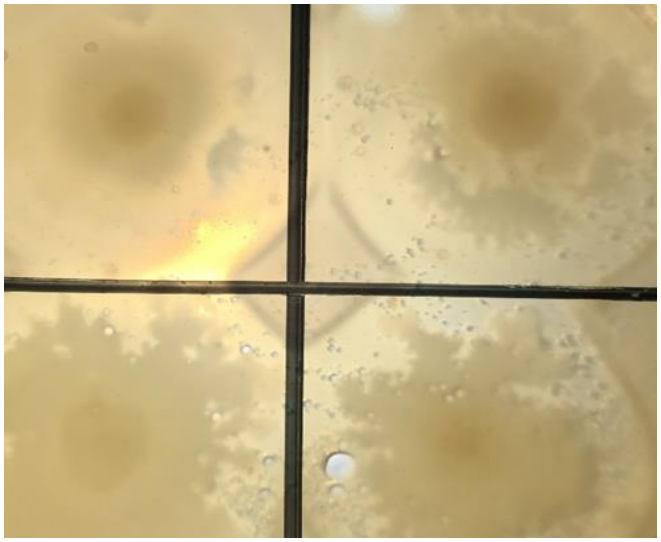


Figure 28: Mise en évidence de la production de lipoprotéinase sur milieu à base de jaune d'œuf.

Une lipoprotéianse positive est révélée par Halo d'éclaircissement apparaissant en premier (Fig.28) autour de spot ensemencé car elle dégrade les protéines du complexe lipoprotéique ce qui augmente la solubilité des lécithines et des lipides contenus dans ce complexe. Pour cela cette action se traduit par un halo d'éclaircissement.

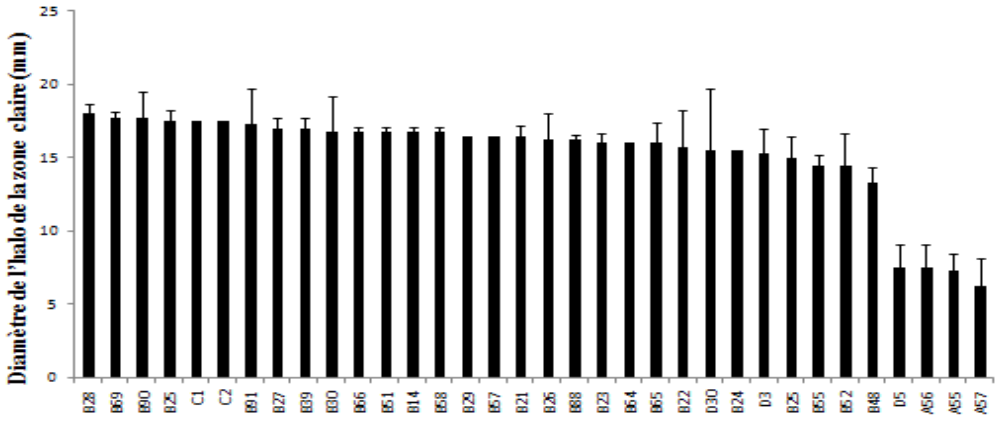


Figure 29: Diamètre de l'halo de la zone claire autour des colonies productrice de lipoprotéinase.

Les résultats de criblage de la lipoprotéase étaient similaires à ceux de la lécithinase , les isolats précédentes sont capable aussi de produire la lipoprotéinase en quantité importante selon le diamètre d'halo qui varie entre 15 -18 mm (Fig.29).

1.10. Amylase

L'amidon est un polymère de glucose qui constitue le glucide principal des graines, son hydrolyse est catalysée par l'amylase qui fournit le glucose, le maltose et les dextrines. Pour toutes les industries basées sur l'amidon, les amylases sont parmi les enzymes hydrolytiques les plus importantes, L'hydrolyse chimique de l'amidon a été entièrement remplacée par les amylases microbiennes. En particulier les α-amylases microbiennes, ont été largement utilisées dans l'industrie de la boulangerie. Dans le pain et les petits pains, afin de donner plus de volume à ces produits, ces enzymes ont été utilisées pour augmenter le volume de la pâte produits aussi pour améliorer la couleur. L'utilisation de l'α-amylase pour la production d'un amidon de faible viscosité et de poids moléculaire élevé pour le revêtement du papier. En outre les amylases ont été utilisées dans les détergents à lessive en poudre. Actuellement, 90% de tous les détergents liquide contiennent de l'α-amylase Avec l'introduction de nouvelles frontières dans la biotechnologie, le champ des utilisations de l'amylase s'est étendu à plusieurs autres fields,tels que la chimie clinique, médicinale et analytique (Saxena et al ., 2007 ; Parrado et al ., 2014) .

Le criblage de l'activité amylolytique de nos isolats sur milieu solide additionné d'amidon a montré que 90 % de nos isolats possèdent une activité amylase positive il s'agit des isolats A71. A68. A67. A60. A57. A56. A55. A53. D8. D3. C4. B92. B74. B69. B58. B55. B48. B39. B21. B14. B51. D5. B88. B70. B17. B12. A69. C1. B91. B90. B87. B79. B65. B64. B57. B52. B30. B25. B22. B23. B24. B25. B26. B27. B28. B29. D30. D31, Celle activité positive a été traduite par l'apparition d'un halo claire autour de la colonie après un traitement avec une solution de lugole (Fig. 30).



Figure 29: Colonie productrice d'amylase (A) et non productrice d'amylase (B).

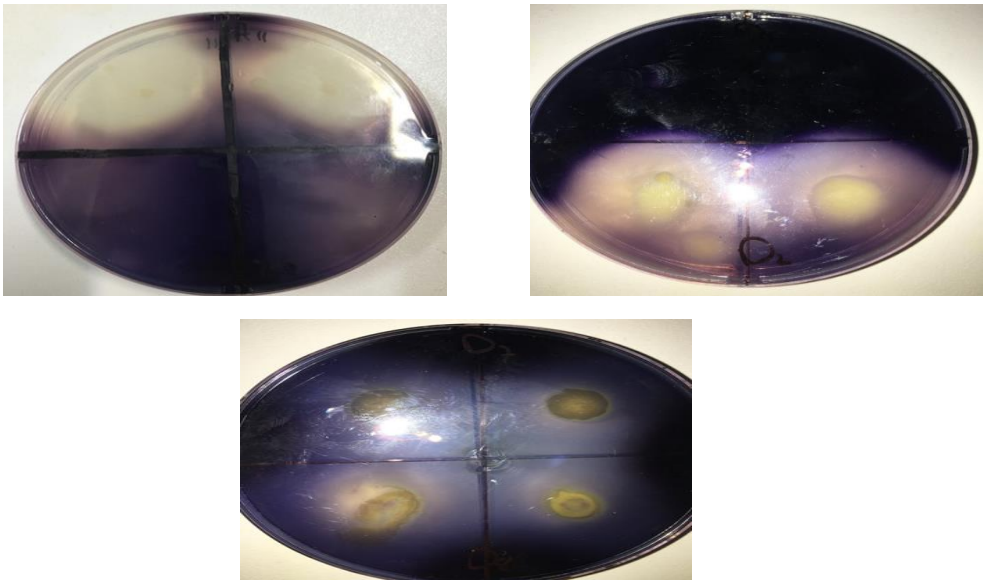


Figure 30: Mise en évidence de la production de l'amylase sur milieu à base

Selon le calcul du diamètre du halo de la zone de dégradation (Fig.32), 33 isolats ont été considéré comme des isolats à forte production d'amylase .il s'agit des isolats A71. A68. A67. A60. A57. A53. D8. D3. C4. B74.B69. B58. B55. B48. B14. B51. B88. B70. B12. A69. C1. B91. B90. B87. B79. B64. B57. B52. B25. B26. B27. B28. D31 au sein de ce groupe le diamètre de l'halo varie de 25 mm à 42 mm. Le second groupe a été représenté par 13 isolats A56. A55. B39. B21. D5. B17. B65. B30. B23. B24. B25. B29. D30 le diamètre de l'halo est de 18 à 24 mm ils ont une production amylolytiquemodérée, tandis que pour le groupe à faible production d'amylase, le diamètre de l'halo est 11 mm et 14 mm respectivement pour les isolats B92 et B22.

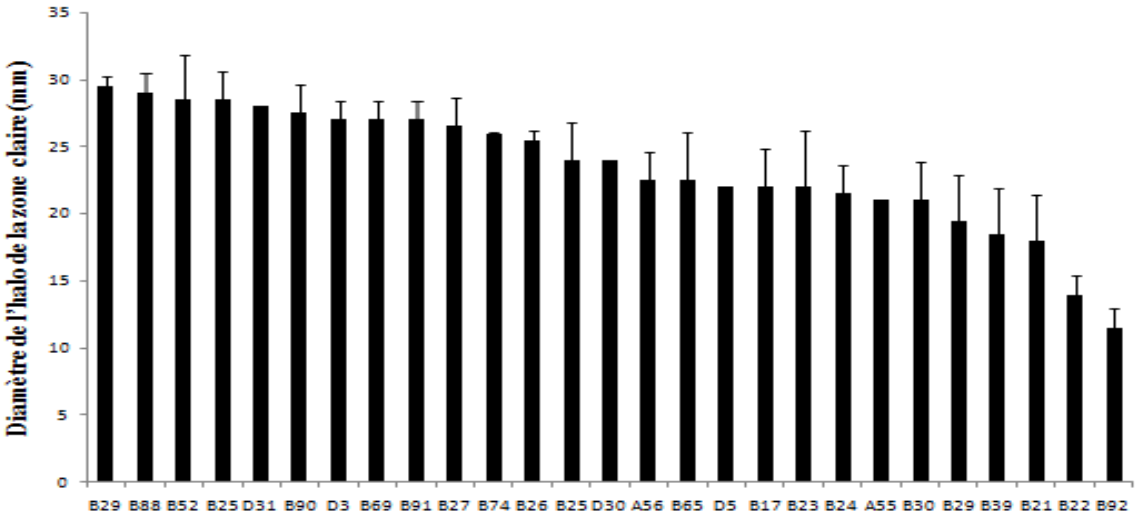


Figure 31: Diamètre de l'halo de la zone claire autour des colonies productrice d'amylase.

D'après Obi et Odibo (1984) Dans leur étude sur *Bacillus sp* ont révélé une production de quantités considérables en α-amylases, 34 sur les 35 souches testées étaient capables de synthétiser et excréter l'α-amylase et d'une manière assez forte

La synthèse des enzymes amylasiques par les bactéries du sol permet une dégradation de la matière organique dans la nature en fournissant des éléments minéraux que les plantes exigent pour leur croissance Abed Hanane (2017) aussi les travaux de Shonkor et *al.* (2011) ont montré que les rhizobactéries sont capables de produire des métabolites ayant un effet bénéfique sur la santé des plantes, les métabolites à activité antibiotiques (contre les phytopathogènes) et les enzymes extracellulaires (amylases, chitinases …etc.). Dans leur étude sur *Bacillus sp*,

2. Optimisation de l'activité amylolytique

La synthèse et la stabilité de l'amylase a été testé en fonction des conditions physicochimique du milieu. Il s'agit de la température, le pH, la salinité et la quantité du substrat. Pour cette optimisation, sept isolats ont été retenus : A53. D8. C4. B87. B79. B25. B26.

2.1. Effet de la température

La température a une importance majeure dans le métabolisme et la croissance des microorganismes (Berry et Foegeding, 1997). L'incubation de nos sept isolats à 3 différentes températures (25°C ,30C°, et 40°C) nous a permis de constater que tous les isolats ont pu synthétiser l'amylase à 25°C et 30C° alors qu'à une température de 40°C seulement deux isolats (A53, D8) ont synthétisé l'amylase.

Tableau 2 : Influence de la température sur l'activité amylolytique des sept isolats.

Condition / Code isolat	25 ° C		30° C		40°C	
	Formation du halo	**Diamètre d'halo (mm)**	**Formation du halo**	**Diamètre d'halo (mm)**	**Formation du halo**	**Diamètre d'halo (mm)**
A 53	+	33a	+	30a	+	18b
D 8	+	37a	+	39a	+	20b
C 4	+	26a	+	28a	-	/
B 87	+	29a	+	32a	-	/
B 79	+	28a	+	30a	-	/
B 25	+	40a	+	45a	-	/
B 26	+	21a	+	42b	-	/

A53, D8, C4, B87, B79, B25et B26 : isolats retenus pour test amylase. (-) : Absence de formation d'un halo autour de la colonie. (+) : Présence d'un halo autour de la colonie. Les valeurs sont données comme la moyenne de trois répétitions indépendantes et portant des lettres différentes (a,b) sont significativement différentes les unes des autres selon le test de différence le moins significative (LSD) à $P<0.05$

Aux températures 25 °C et 30°C, tous les isolats ont montré une activité amylolytique élevée qui est traduite par le diamètre de l'halo. Cette production est encore plus importante à 30°C à l'exception de l'isolat A53 qui a montré une diminution non significative à $P<0.05$. Pour l'isolat B26, la différence de diamètre de l'halo est importante, il passe de 21 mm à 25 °C et arrive à 42 mm à 30 °C, ce qui est le double. Cette augmentation est considérée comme significative à $P<0.05$.

Cette forte activité de l'enzyme amylase à cet intervalle de température peut être expliquée par la nature mésophile des isolats appartenant au genre Bacillus (Bertoldo et Antranikian, 2001). Plusieurs auteurs ont rapporté que la majorité des amylases bactériennes ont une température optimale dans la plage de 30 à 100°C (Cordeiro et al., 2002).

L'effet de la température sur l'activité de l'α-amylase s'est avéré maximal à 40°C (Tab.2). En effet sur l'ensemble des isolats testé, seulement deux isolats: A53 et D8 ont montré une production de l'enzyme autour de la colonie. Les travaux de Vidyalakshmi et al (2009) ont montré que l'activité de l'α-amylase a significativement diminué avec l'augmentation de la température au-delà de 37°C.

La présence de l'amylase chez les isolats A53 et D8 est due probablement à leur caractère thermotolérant (40°C). Les Bacillus thermophiles ont développé une variété de stratégies moléculaires pour survivre aux conditions environnementales extrêmes. Pour l'utilisation des substrats naturels, un nombre de Bacillus thermotolérante, produisent une gamme d'enzymes hydrolytiques (amylase protéase, cellulase, glucosidase, glucoamylase, pullulanases, cyclodextrineglycosyltransferase). Elles sont également capables de dégrader d'autres polysaccharides (Pinzón- Martínez et al., 2010).

Les travaux de Praveen Kumar et *al*., (2014) ont démontré que des souches de *Bacillus* spp.et qui ont été isolée à partir des zones arides pouvaient tolérer les températures élevée (50°C). Cela pourrait être dû à leur capacité de former des endospores. Par contre, l'incapacité de la majorité de nos isolats asynthétiser l'amylase peut-être expliqué par la nature thermolabile de l'enzyme. La thermolabilité est une altération ou une perte de ses propres qualités par l'action de l'augmentation de la température (Mesbah et Wiegel, 2008 ; Wagner et Wiegel, 2008). Nos résultats ne concordent pas avec les travaux de Yang L et *al* (2016) qui ont montré que quelques souches *Bacillus* peuvent se développer à intervalle de température allant entre 8°C et 45°C, mais reste à confirmer s'il s'agit bien des mêmes espèces de Bacillus.

2.2. Effet de pH

Le pH est l'un des facteurs d'influence évidents de l'activité microbienne (Woyessa et Assefa., 2011). Il ressort du test de l'effet du pH sur la croissance et l'activité amylolytique que l'ensemble de nos isolas ont montré une amylase positive dans les quatre pH testé (pH 5, pH 7 . pH 8 . pH 10).

L'isolat C4 était incapable de produire l'amylase à pH 7 , 8 et 10 ainsi la synthèse d'amylase était négatif chez l'isolat B25 à pH 5 (Tab. 3) .

L'effet de la variation de la gamme de pH sur la capacité de nos isolats à produire l'amylase a montré que cinq parmi les sept isolats testé ont une forte production d'amylase à pH10. Bien que cette différence de production n'a pas été significative ($P<0.05$) que avec les isolats B26, B79 et A53. Plusieurs travaux réalisés sur les espèces appartenant au genre *Bacillus sp*. ont montré que l'activité maximale de l'amylase est dans la plage de pH 3,5 à 7,0 avec une plage de pH optimale de pH 6,0 à 8,0 ou pH 5,0 à 7,0 (Salwa el al.,2012).

Les travaux réalisés par Eduardo et al (2000) ont montré qu'il existe une forte corrélation entre le pH optimum de croissance des isolats et la production de l'enzyme amylase. En effet, nos résultats sur la tolérance de nos isolats aux différents pH ont montré une croissance à pH10.

L'isolat C4 a montré une seulement une production de l'amylase qu'à pH5 avec un diamètre d'halo de 26 mm. En effet, il existe des rapports antérieurs sur l'activité de certaines amylases à faible pH, telles que celles produites par *Bacillus subtilis* (Pandey et al.,2000).

Les isolats B79 et B26 ont montré une capacité à produire l'amylase dans toute la gamme de pH testé. Ce ci est un critère très important lors de la sélection des enzymes pour une éventuelle application industrielle. Cette capacité de croissance de nos isolats aux différents pH et leur activité enzymatique importante peut être expliquée par l'existence d'un bon potentiel de tolérance sur une plage de pH large. Cette particularité à été confirmé par les résultats des travaux de Lugtenberg et al (2013) sur la tolérance des espèces *Bacillus spp* et ce qui leur confère une adaptation aux différents pH.

Tableau 1: Influence de pH sur l'activité amylolytique des sept isolats.

Condition / Code Isolats	pH 5		pH 7		pH 8		pH 10	
	Formation du halo	**Diamètre d'halo (mm)**	**Formation du halo**	**Diamètre d'halo (mm)**	**Formation du halo**	**Diamètre d'halo (mm)**	**Formation du halo**	**Diamètre d'halo (mm)**
A 53	+	20a	+	17a	+	ND	+	32b
D 8	+	22a	+	ND	+	18a	+	22a
C 4	+	26a	-	-	-	-	-	-
B 87	+	25a	+	29a	-	-	+	26a
B 79	+	27a	+	20a	+	11b	+	35c
B 25	-	-	+	13	+	20	+	23
B 26	+	20a	+	17a	+	10b	+	37c

A53,D8,C4 ,B87,B79,B25et B26 :isolats retenus pour test amylase.(-) :Absence de formation d'un halo autour de la colonie. (+) : Présence d'un halo autour de la colonie.ND : non déterminé. Les valeurs sont données comme la moyenne de trois répétitions indépendantes et portant des lettres différentes (a,b,c) sont significativement différentes les unes des autres selon le test de différence le moins significative (LSD) à $P<0.05$

2.3. Effet de la salinité

La résistance des bactéries aux concentrations élevées en sel constitue des traits physiologiques importants pour la survie et qui se reflète son multiples activités (Khodair et al., 2008).

Les résultats obtenus montrent que tous nos isolats ont présenté une production d'amylase dans les milieux contenant les différentes concentrations de NaCl : 50, 100,150, 200 et 250 mM (Tab.4).

La présence de sel sous forme de NaCl à des concentrations faibles à modérée n'a pas affecté négativement la production de l'enzyme. Bien au contraire, nous avons noté une augmentation du diamètre de l'halo chez les isolats : C4 et B79 à une concentration de 150mM par rapport au témoin. Seul l'isolat B25 qui a montré une diminition significative du diamètre de l'halo à 150 mM de NaCl. Au delà, bien que la production est considérée comme importante mais une diminution significative à $p<0.05$ a été noté.

Ces résultats se confirment à travers les travaux de Sivaramakrishnan et al (2006) qui démontrent que la contrainte saline par application du NaCl ou du CaCl2 favorise la synthèse et l'activité de l'amylase.

Les résultats obtenus vont dans le même sens avec le test réalisé sur la croissance de nos isolats à différentes concentrations de salinité (Tab.4) et d'un autre côté sont similaires aux travaux de Praveen et al (2014) qui ont démontré que la plupart des souches du genre *Bacillus* peuvent tolérer jusqu'a une concentration de 1.2M de NaCl, ces travaux attestent que ces bactéries semblent avoir une forte tolérance au sel.

L'adaptation des bactéries à des fortes concentrations en sel est due à leur faculté de synthèse et d'accumulation intracellulaire des solutés compatibles qui ont un rôle d'osmo-régulateurs et protecteurs contre les effets néfastes de la salinité et elle est aussi en relation avec leur capacité à produire des exopolysacharides qui forme une

couche protectrice contre la dessiccation et le stress salin. Selon Khodair et *al* (2008) l'impact potentiel remarquable chez les *Bacillus spp.* est de limiter l'influx de Na dans les racines, permettant ainsi aux plantes sensibles au sel pour survivre et prospérer sous stress salin.

Tableau 4. Influence de la salinité sur l'activité amylolytique des sept isolats .

A53,D8,C4 ,B87,B79,B25et B26 :isolats retenus pour test amylase.(-) :Absence de formation d'un halo autour de la colonie. (+) : Présence d'un halo autour de la colonie.ND : non déterminé. Les valeurs sont données comme la moyenne de trois répétitions indépendantes et portant des lettres différentes (a,b,c) sont significativement différentes les unes des autres selon le test de différence le moins significative (LSD) à P<0.05

Condition / Code isolat	NaCl 0Mm		NaCl 50 mM		NaCl 100 mM		NaCl 150 mM		NaCl 200 mM		NaCl 250 mM	
	Formation du halo	Diamètre d'halo (mm)	Formation du halo	Diamètre d'halo (mm)	Formation du halo	Diamètre d'halo (mm)	Formation du halo	Diamètre d'halo (mm)	Formation du halo	Diamètre d'halo (mm)	Formation du halo	Diamètre d'halo (mm)
A 53	+	30a	+	29a	+	ND	+	29a	+	ND	+	20b
D 8	+	39a	+	36a	+	ND	+	25b	+	27b	+	30ab
C 4	+	28a	+	29a	+	ND	+	30a	+	19b	+	20b
B 87	+	32a	+	31a	+	ND	+	ND	+	22b	+	21b
B 79	+	30a	+	ND	+	ND	+	31a	+	ND	+	ND
B 25	+	45a	+	ND	+	ND	+	32b	+	ND	+	ND
B 26	+	42a	+	ND	+	ND	+	36a	+	ND	+	ND

2.4. Effet de la quantité d'amidon

L'amidon est un composant important dans l'activité amylolytique. L'incubation de nos sept isolats à trois différentes concentrations de l'amidon (0.25%, 0.5% ,1%) nous a permis de constater que tous les isolats ont une capacité de synthétiser l'amylase avec une activité légèrement élevée

Tableau 5: Influence de la quantité d'amidon sur l'activité amylolytique des sept isolats.

Condition / Code Isolats	Amidon 1 %		Amidon 0.5 %		Amidon 0.25 %	
	Formation du halo	**Diamètre d'halo (mm)**	**Formation du halo**	**Diamètre d'halo (mm)**	**Formation du halo**	**Diamètre d'halo (mm)**
A 53	+	30a	+	34a	+	29a
D 8	+	39a	+	23b	+	30c
C 4	+	28ab	+	21a	+	31b
B 87	+	32a	+	31a	+	30a
B 79	+	30a	+	25a	+	30a
B 25	+	45a	+	29b	+	27b
B 26	+	42a	+	33b	+	33b

A53,D8,C4 ,B87,B79,B25et B26 :isolats retenus pour test amylase.(-) :Absence de formation d'un halo autour de la colonie. (+) : Présence d'un halo autour de la colonie. Les valeurs sont données comme la moyenne de trois répétitions indépendantes et portant des lettres différentes (a,b) sont significativement différentes les unes des autres selon le test de différence le moins significative (LSD) à $P<0.05$

La quantité d'amidon ajouté au milieu comme substrat n'affecte pas sur l'activité enzymatique. Les isolats testés ont montrés une activé élevée dans les trois milieux (1%,0.5%,0.25%) avec une augmentation de la production de l'enzyme avec une concentration de 1%. En effet, l'activité amylolytique est légèrement meilleure à (1%) pour la majeure partie des isolats. avec une augmentation significative à $P<0.05$ pour les isolats B25 et B26 avec un diamétre d'halo de 45mm et 42 mm respectivement. Un

résultat similaire a été observé par Božić, et al (2011) qui ont trouvé que 0,5 % d'amidon était une concentration appropriée pour la production d'α-amylase par *B. subtilis* IP 5832. Aussi, Reyed, (2007) et Fatoni et Zusfahair (2012) ont rapporté que l'α-amylase était maximale à des concentrations de 5 % et 10 % d'amidon respectivement.

Les milieux à (0.5% et 0.25%) avaient montré des résultats presque rapprochés, avec une plage de diamètre d'halo allant entre 21mm jusqu'à 33mm. Ce qui implique que nos isolats sont des oligotrophes et peu du substrat permet 4une grande production d'amylase.

3. évaluation quantitative sur la production d'amylase

L'évaluation de l'activité des amylases de nos isolats a été réalisée par une détermination de la quantité du glucose libérée dans le milieu**.** Les amylases 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 ;Alais et al., 2008).

La gamme d'étalonnage du sucre réducteur glucose pur présente un coefficient de régression positif R2 = 0,78 très proche de la valeur 1 (Fig.33). 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. 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 (Tab.6).

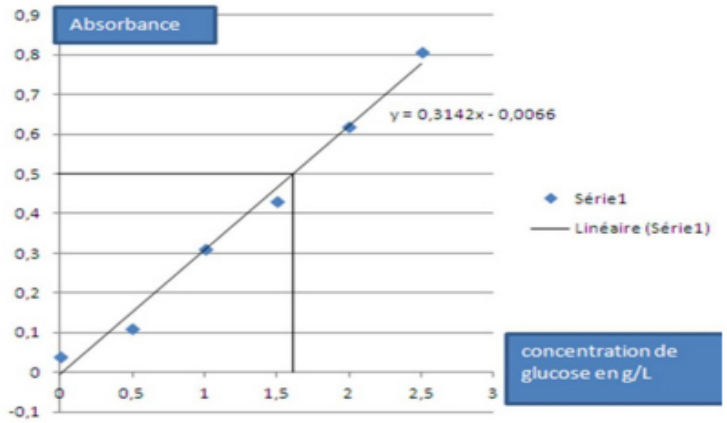


Figure 32: Courbe d'étalonnage de glucose ($g.l^{-1}$).

Tableau 6:. Evaluation quantitative de la production enzymatique.

Code d'isolats	Absorbance (=487nm)	Concentration de glucose produite ($g.l^{-1}$)
A53	1.015	3.25
D8	0.607	1.95
C4	0.725	2.32
B87	0.587	1.88
B79	1.470	4.70
B25	1.369	437
B26	1.618	5.17

L'ensemble de nos isolats on montré une production du glucose. Les isolats A53, B79, B25 et B26 ont présenté les plus élevée quantité de glucose avec un maximum de production de 5.17 $g.l^{-1}$ avec l'isolat B26. En effet, les Bacillus sont considéré comme des bons candidats pour la production de l'amylase et donc leur potentielle utilisation en industrie agro-alimentaire (Ben Baghdad et Boussada, 2016). Cette activité enzymatique est conditionnée par plusieurs paramètres. Les travaux de Jean-Paul et al (2016) ont montré que la quantité de glucose produite dépend principalement des conditions de culture et dont la plus importante est la durée d'incubation

4. extraction et purification d'amylase

A partir des deux isolats B79 et B26, une extraction de l'enzyme amylase brute a été réalisé selon la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium.

L'extrait brute de l'alpha amylase a été dosé par la méthode de Biorad pour déterminer les taux des protéines totaux. Les résultats (Tab.7) ont montré un taux des protéines totaux de 3.79 pour l'isolat B26 et 3.45 pour l'isolat B79.Ces teneurs sont similaires à celle de *Bacillus subtilis* (Asgher et al.,2007) et *Bacillus amyloliquefaciens* (Maous,2016).

Gupta et al (2003) Ont constaté que la production d'α-amylase est maximale lorsque l'amidon est utilisé comme source de carbone. Cependant, la biosynthèse de l'enzyme a eu lieu non seulement en présence d'amidon, mais aussi avec d'autres sources de carbone. Des études antérieures ont rapporté que des substrats complexes induisent une plus grande production d'amylase. (Sexana et al ; 2007)

L'activité de l'extrait enzymatique brut a été testée par une estimation de la quantité du glucose libérée après l'hydrolyse du substrat l'amidon.

Les résultats (Tab.7) ont montré une augmentation significative ($P<0.05$) de la production du glucose avec l'extrait enzymatique par rapport à l'utilisation des colonies. Ces résultats confirment que les extraits enzymatiques sont riches en amylases.

Tableau 7: Mise en évidence de l'activité amylolytique des extraits enzymatiques.

Code d'isolat	Taux des protéines ($mg.ml^{-1}$)	Quantité de glucose produite ($g.l^{-1}$)	
	Extrait enzymatique	Suspension bactérienne	Extrait enzymatique
B79	3.45	4.70a	31.22b
B26	3.79	5.17a	47.58b

5. Caractérisation morphologique

5.1. Etude macroscopique

Nos isolats forment sur le milieu TSA1/10 des colonies visibles à l'œil nu après 24-48 h d'incubation à 30°C, leur taux de croissance est donc peu variable.

Les colonies formées par nos isolats (Fig. 34) sont toutes circulaires, de texture homogène, à bord régulier et à élévation convexe. Elles sont de couleur blanche ou crème et ne montrent pas de pigmentation ou de fluorescence naturelle. Elles présentent pour la plupart un aspect gommeux, brillant et translucide en relation avec l'excrétion de polysaccharides (exopolysaccharides ou EPS).

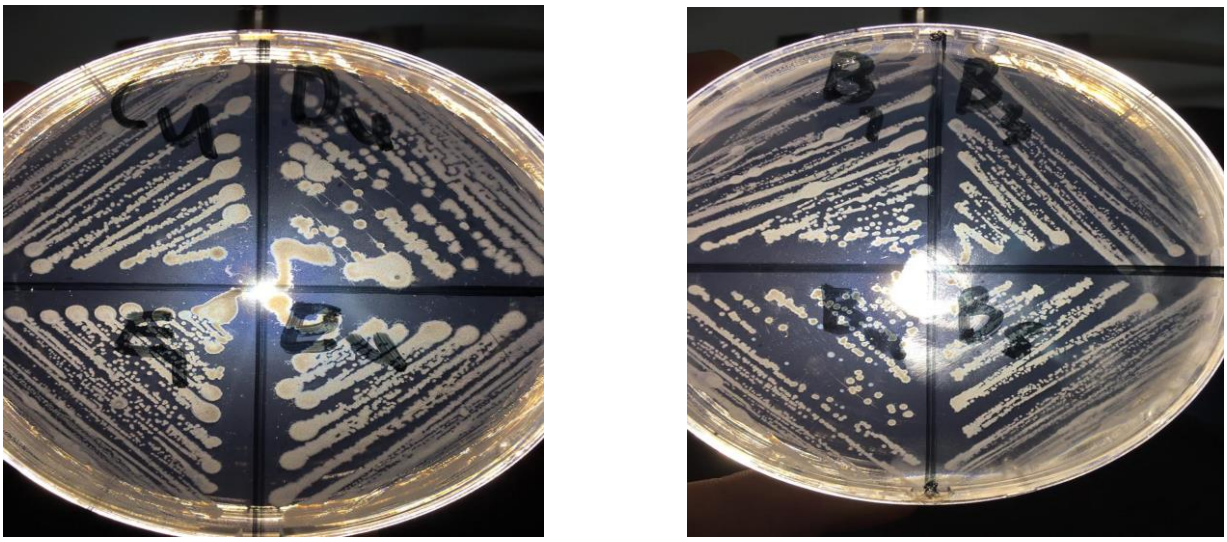


Figure 33: Aspects morphologique des colonies des Bacillus.

La taille de nos colonies s'échelonne entre 3 à 4 mm pour les souches *D8, C4, A53, B26, B79* et 1 à 2 mm pour les souches *B25* et *B87* .

5.2. Etude microscopique

L'observation microscopiques réalisées sur des cellules âgé de 1 jour sont fixées et colorées par la technique de Gram, modifiée par Vincent (1970), nous a permis de vérifier que toutes nos souchesA53. D8. C4. B87. B79. B25. B26 sont des bactéries à Gram positif, avec une dominance de 71 % de la forme bacille, la forme Cocobacille a été observer pour les souche *B87 et B79* (figure 35) .

La taille de nos cellules bactériennes varie entre 2 et 10 µm de long et 0.5 à 2µm de large, la plupart ont des bords parallèles et des extrémités rondes ou tronquées.

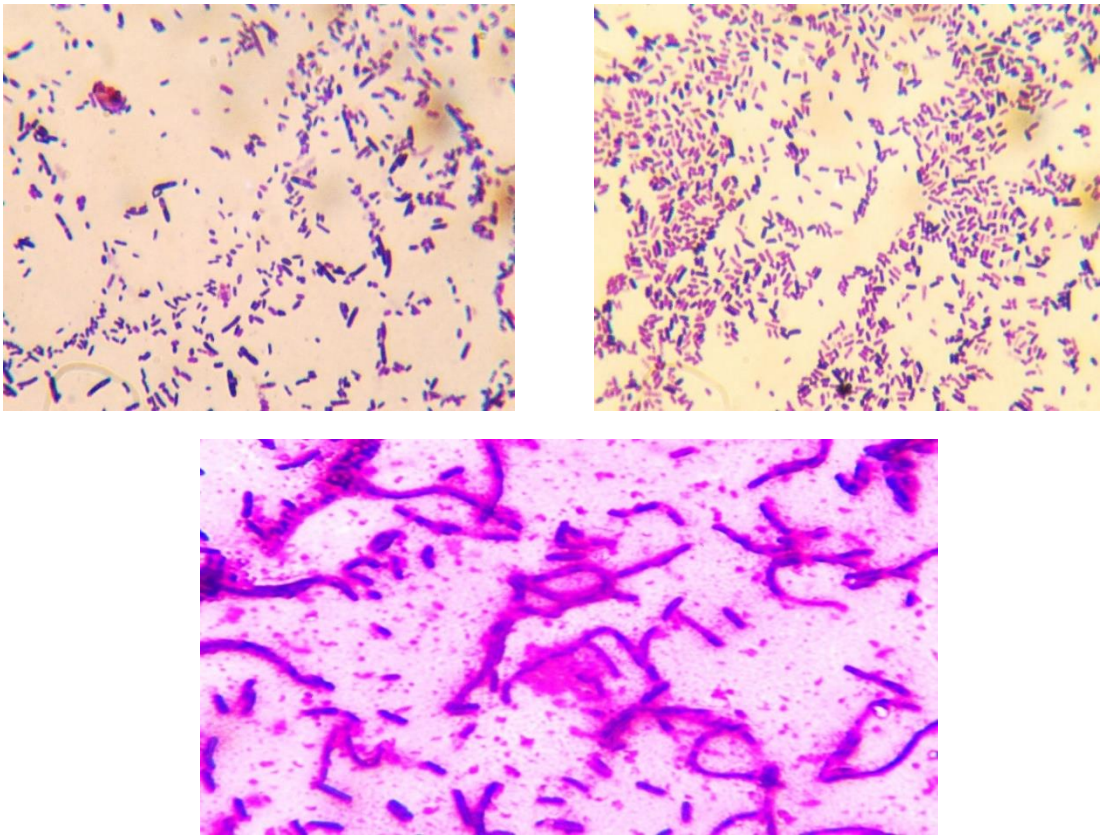


Figure 34: Observation des cellules au microscope photonique (x100) après coloration de Gram.

Les sept souches étudiées constituent un ensemble remarquablement homogène. Elles ont présenté des traits coloniaux et cellulaires caractérisant les souches appartenant au genre *Bacillus spp.* Des résultats similaires ont été trouvés chez Azrou et Guettafi (2014), qui ont montré que les souches du genre *Bacillus* isolée à partir du sol de la région d'akbou wilaya de Bejaïa sont des bactéries à Gram positif. Aussi, selon les études d'Amir et *al*. (2005), qui ont constatés que la plupart des rhizobactéries ont été caractérisés comme des bactéries à gram positif**.**

5.3. Caractérisation biochimique

5.3.1. Catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs, elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en dioxygène.

Les résultats obtenus montrent que la totalité de nos souches se sont révélées catalase positive donc la totalité de nos souches se sont des aéro-anérobies facultatifs (figure 36).



A **B**

Figure 35: Mise en évidence de la réaction gazeuse catalysée par l'enzyme Catalase.

A : Réaction catalase négative. B : Réaction catalase négative.

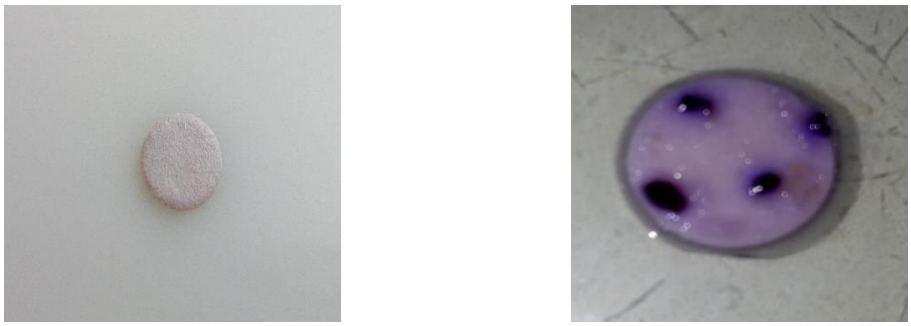
Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Bouras (2018) ; Mishra R. et *al* (2010) ; Rayavarapu V.B. et Padmavathi T. (2016) ; Azrou S. et Guettafi N. (2014) ; Wahyudi A.T. et *al* (2011) ; Ali Nawab et *al* (2016) qui ont constaté que les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont des catalase positive.

L'absence de catalase, qui est assez rare chez les *Bacillus* et signalé seulement, semble-t-il, chez certains représentants du genre *Bacillus* en occurrence *B. stearothermophilirs* et chez les trois espèces *B. larvae, B. popilliae et B. lentitnorbus* qui sont pathogènes pour les insectes (Gordon et *al*. 1973).

5.3.2. Oxydase

L'oxydase ou Cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaines respiratoires cytochromiques bactériennes. Ce test, standardisé pour l'identification bactériologique (Prescott, 2007) met en évidence la présence d'une cytochrome-oxydase qui oxyde le cytochrome c réduit.

Les résultats obtenus ont montré que nos sept souches de *Bacillus spp* isolée à partir du sol rhizosphérique sont capables de produire l'enzyme oxydase (figure 37).



A B

Figure 36: Mise en évidence de l'enzyme cytochrome oxydase.Mise en évidence de l'enzyme cytochrome oxydase.

A : Disque oxydase avec une réaction négative.

B : Disque oxydase avec une réaction positive

Du même Les résultats de Bouras F.Z. (2018) selon laquelle les *Bacillus spp.* isolées à partir du sol rhizosphérique de cinq sites différents : Ain Temouchent, Tessala, ITCMI, Sfisef et KaiedBelarbi révélées oxydase positif.

5.3.3. Mobilité

La détermination de la mobilité de nos isolats par observation microscopique des cellules à l'état frais a été renforcée par une mise en évidence sur le milieu de culture mannitol-mobilité. Les résultats obtenus (figure 38) ont confirmé la mobilité de toutes nos souches retenues pour cette étude. La mobilité a été traduite en changeant la couleur du milieu au jaune qui est dû à la fermentation du manitol par nos souches. Ces souches diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, en créant un trouble du milieu.

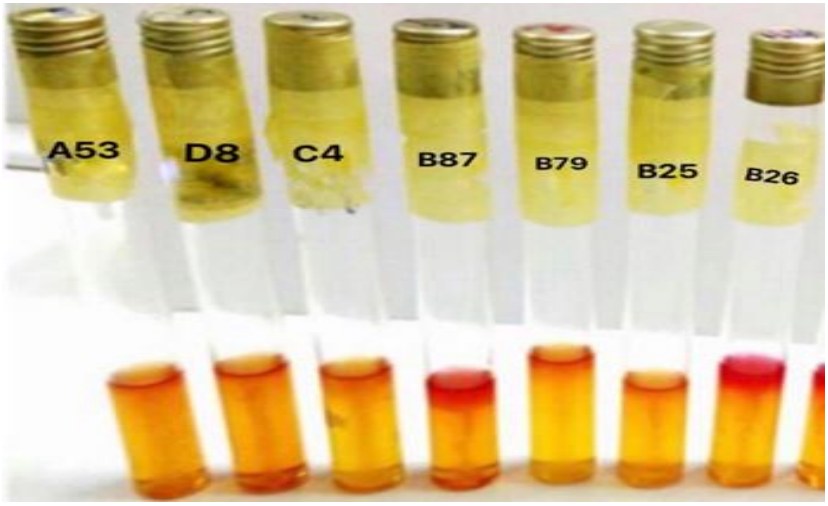


Figure 37: Test positif de mannitol et mobilité pour les dix isolats.

Selon les résultas de Liddell et all La mobilité dans la région racinaire est importante en présence d'une irrigation intermittente. Alors que les isolats de rhizobactéries peuvent descendre sur les racines sur des distances considérables en percolant de l'eau (Liddell et Parke, 1989), seuls les isolats mobiles peuvent potentiellement se propager et coloniser les racines latérales formées entre les cycles d'irrigation (Misaghi et *al*., 1992).

5.4. Caractérisation physiologique

5.4.1. Tolérance aux pH

Le pH est l'un des facteurs d'influence évidents de l'activité microbienne et des populations dans le sol (Woyessa et Assefa, 2011).

L'effet de la variation de la gamme de pH sur nos isolats a montré que toutes nos souches peuvent croître à pH acide (2 et 4), pH neutre (7) et pH alcalin (10 et 12) (figure 39)

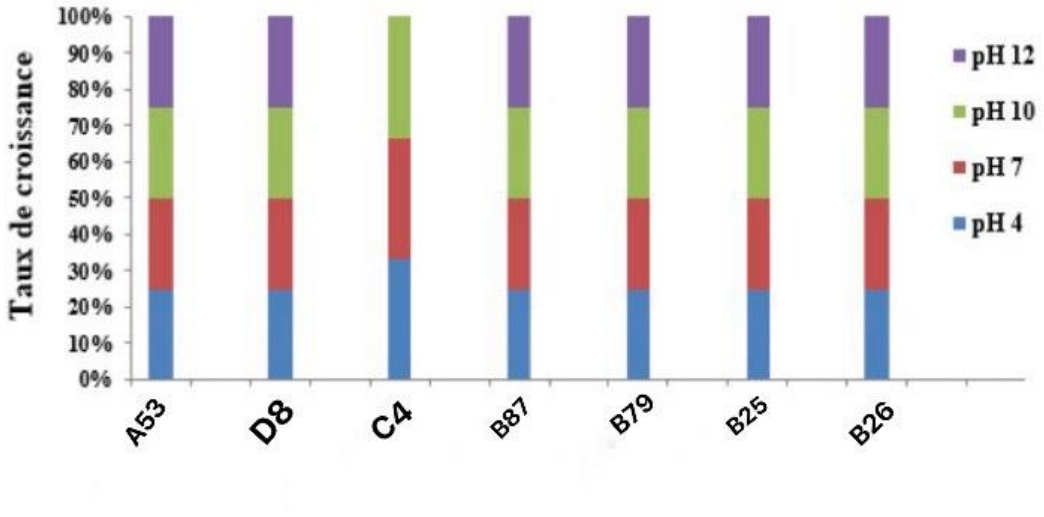


Figure 38: Tolérance des isolats de Bacillus spp. testés à différentes valeurs de pH.

Cette capacité de croissance de nos isolats aux différents pH peut être expliquée par l'existence d'un bon potentiel de tolérance sur une plage de pH large. Cette particularité à été confirmé par les résultats des travaux de Lugtenberg et *al* (2013) sur la tolérance des espèces *Bacillus spp* et ce qui leur confère une adaptation aux différents types de sol.

5.4.2 Tolérance à la température

La température a une importance majeure dans le métabolisme et la croissance des microorganismes (Berry &Foegeding, 1997). L'incubation de nos sept isolats dans une plage de températures allant de (4C° jusqu'à 60 °C) nous a permis de constater que tous les isolats ont pu se développer à toutes les températures (figure 40).

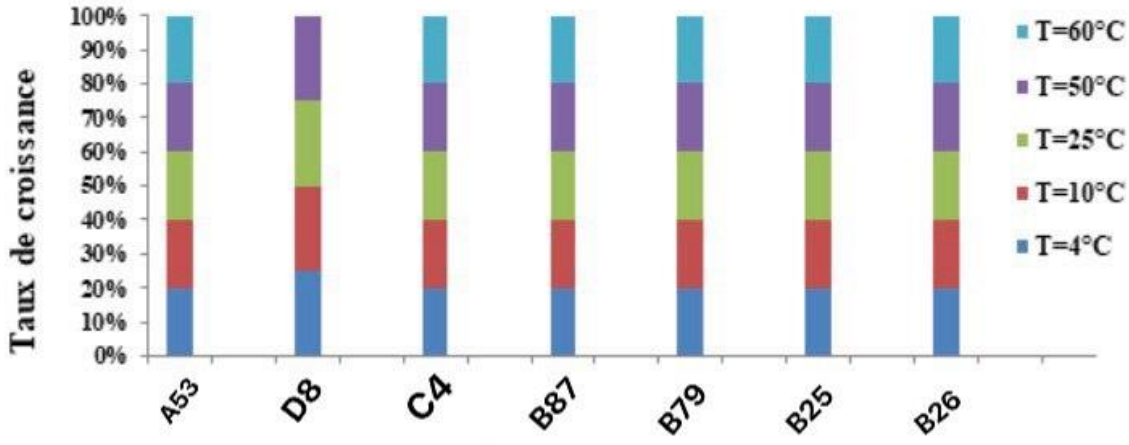


Figure 39: Tolérance des isolats de Bacillus spp. testés à différentes températures.

les travaux de PraveenKumar et *al*., (2014) ont démontré que la plupart des souches de *bacillus*spp. pouvaient tolérer les températures élevée (50°C), Cela pourrait être dû à leur capacité de former des endospores.

5.4.3. Tolérance à la salinité

Afin de pouvoir tester la tolérance de nos souches aux stress salin, nous avons provoqué la salinité par l'ajout de NaCl e à différentes concentrations. La totalité des souches ont montré une prolifération aux différentes concentrations de sel appliqué (figure 41).

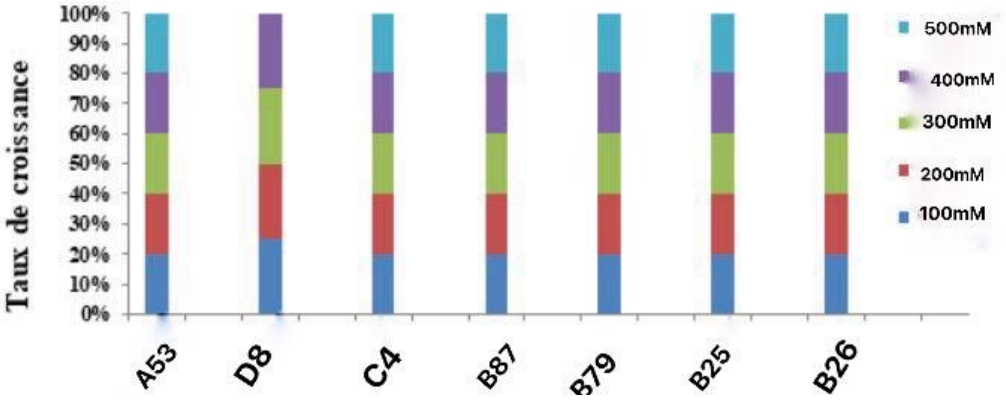


Figure 40: Tolérance des isolats de Bacillus spp. testés à différentes valeurs de salinité.

Les résultats que nous avons obtenus sont similaires aux travaux de PraveenKumar et *al*., (2014) qui ont démontré que la plupart des souches du genre *Bacillus* peuvent tolérer jusqu'a une concentration de 1.2M de NaCl, ces travaux attestent que ces bactéries semblent avoir une forte tolérance au sel.

5.5. Caractérisation métabolique

5.5.1. Fixation d'azote

L'azote est considéré comme un élément nutritif clé dans la production des cultures agricoles et l'un des principaux constituants des protéines, des acides nucléiques et des autres composants cellulaires essentiels (Martinez-Vivero et *al*., 2010). La fixation d'azote moléculaire est considérée comme l'un des principaux mécanismes par lequel la plante bénéficie de l'association microbienne, et elle constitue une source majeure de l'azote pour les plantes dans le cadre d'une pratique agricole respectueuse de l'environnement (Cakmakci et *al* ., 2006).

La fixation de l'azote est évaluée par l'étude de la croissance bactérienne sur milieu de culture dépourvu d'azote , Nos résultats indiquent que sur les sept souches de *bacillus*, quatre ont été capables de fixer l'azote atmosphérique. Il s'agit de *A53. B87. B79. B26 .(* figure 42*)*

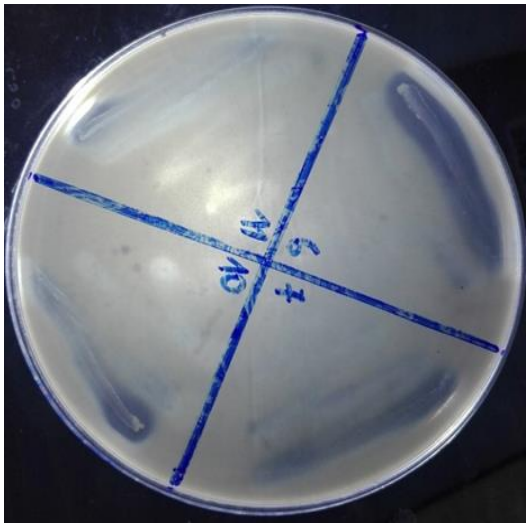


Figure 41: Mise en évidence des bacillus spp fixatrice d'azote.

La capacité à fixer l'azote moléculaire par les bactéries appartenant au genre *Bacillus* a été étudié par Guemori-Athmani et *al*., (2000) qui ont montré que 50% de leurs souches isolés de *Bacillus* sont capables de fixer l'azote atmosphérique, cette capacité mesurée par l'activité de la nitrogénase existe chez *Bacillus* et *Peanibacillus*isolés du sol algérien.

Les bactéries diazotrophiques intervenant dans la fixation d'azote en échange avec le carbone libéré sous forme d'exsudats racinaires constitue un avantage majeur pour les plantes. De nombreux travaux réalisés par (Ding *et al.,*2005 ; Ding *et al.,* 2005) ont rapporté sur l'application de diazotrophes libres, telles que *Bacillus sp,* dans l'augmentation des rendements accrus de diverses cultures et l'absorption élevée des éléments tels que le phosphore et l'azote dans les plantes inoculées (Arau'jo, 2008).

5.5.2. Production de sidérophores

La plupart des microorganismes ont développé un mécanisme hautement spécifique afin de l'assimiler via la production de sidérophores qui dépend des caractéristiques du sol, de la concentration en oligo–éléments, notamment en fer, pH du sol et de la disponibilité du carbone et de l'azote. . En plus de ces facteurs, certains métaux lourds, tels que le zinc et le cadmium semblent stimuler leur production. (Ramette et *al.,* 2003). Les sidérophores procurent une protection aux plantes contre plusieurs maladies fongiques ou bactériennes (Siddiqui et *al.*, 2003), et cela est possible grâce à des composés qui inhibent la croissance des champignons phytopathogènes.

La production de sidérophores basée sur l'apparition d'une zone de couleur jaune orangée autour de la colonie inoculée sur des plaques de gélose CAS était enregistrée chez seulement deux souches B26 et B79 . (figure 43).

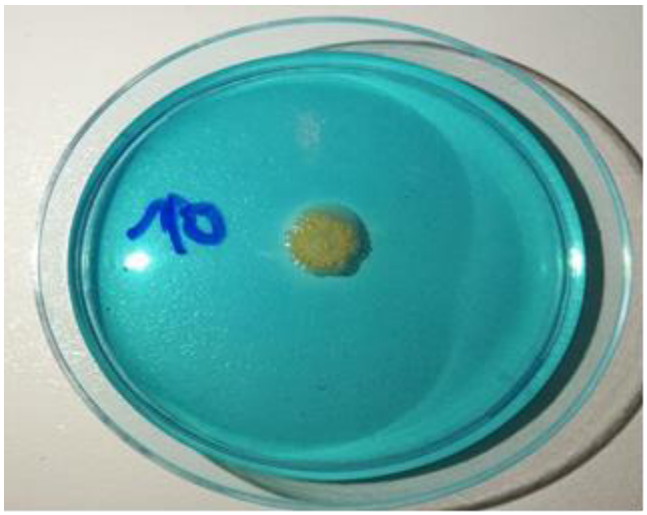


Figure 42: Production de sidérophore par B.subtilis subspp.

Contrairement à nos résultats, les travaux de Cherif et *al* (2014) ont rapporté que la majorité des souches du genre *Bacillus* isolées à partir de la rhizosphère du blé et de l'orge situé en zone aride de l'Algérie (Bou-saadaa, Djelfa) produisent des sidérophores à des taux très variables. Aussi, Beneduzi, A et *al (*2008), ont trouvé que tous les *Bacillus sp* isolé sont des sidérophores positives.

5.5.3. Evaluation de la formation de biofilm

La formation de biofilm concerne le pouvoir de colonisation du système racinaire par les bactéries et il est considéré comme une propriété essentielle étant donné que la multiplication des cellules bactériennes au niveau des racines est nécessaire à l'expression de toute activité stimulatrice de la croissance des plantes. Les biofilms sont des communautés microbiennes uni ou multi adhérentes aux surfaces biotiques ou abiotiques et / ou en contact intime l'une avec l'autre, enfermées dans une matrice auto-produite de substances polymères extracellulaires (EPS). Les biofilms rhizosphériques sont des biofilms positifs par opposition aux biofilms négatifs qui sont à l'origine des problèmes de contaminations microbiennes. La production de biofilm par PGPR reflète leur pouvoir de colonisation du système racinaire et est considéré comme une activité PGPR importante (Prescott et *al*., 2003)

Dans cette étude, nous avons étudié la capacité de nos isolats a formé des biofilm par la méthode de Gélose Rouge Congo (méthode qualitative) décrite par Freeman et *al.* (1989) utilisés dans les laboratoires de routine.

Les résultats obtenus ont montré que parmi les 7 souches de *Bacillus spp* (100%) isolée à partir du sol rhizosphériques, une proportion de 42.8% de ces souches sont formatrice de biofilm sur le milieu rouge Congo *(B25, D8, B79)* et 57.1% de ces souches sont non formatrice de biofilm (*C4, A53, B26, B87)***.**

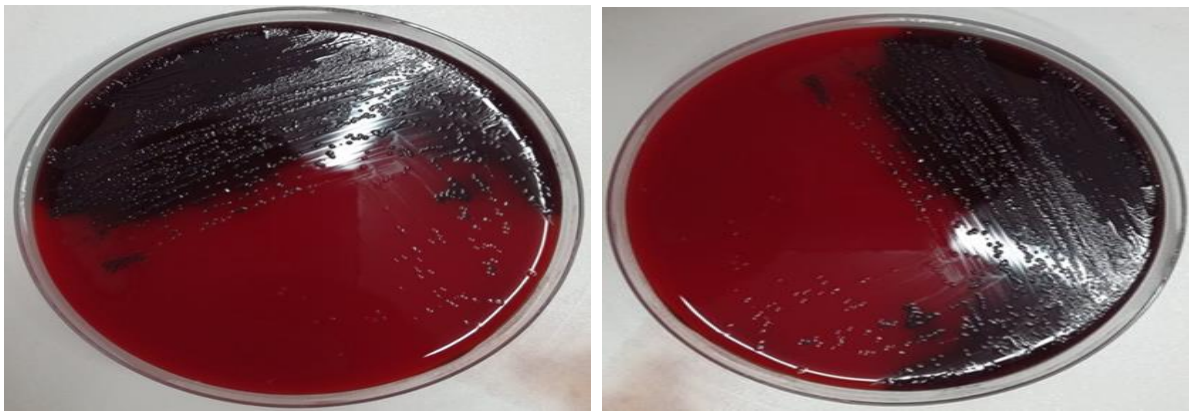


Figure 43: Mise en évidence de la formation de biofilm par les isolats.

Tableau 8: Résultats de formation de biofilm par les souches de Bacillus.sp par la méthode Rouge Congo(RCA).

ID	Couleurs	Phénotypes
B25	Noir	positive (+)
D8	Noir	positive (+)
C4	Rouge	négative(-)
A53	Rouge	négative(-)
B26	Rouge	négative(-)
B79	Noire	positive (+)
B87	Rouge	négative (-)

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Timmusk et *al*., 2013, qui ont rapporté que les rhizobactéries ont la capacité de former des biofilms en sécrétant des polysaccharides et des protéines, la matrice ainsi formée limite la diffusion de composés tels que les hormones de croissance végétale et les nutriments du voisinage de la plante,

favorisant ainsi la croissance des plantes en atténuant les condition de stress. Aussi, Les biofilms formés par le PGPR autour des racines sont constitués de populations bactériennes ou de communautés bactériennes encapsulées dans la matrice extracellulaire polymérique formée par les bactéries elles-mêmes, elles ont adhéré aux surfaces externes suffisamment humides (Hafsa N. et *al.,* 2018)

Conclusion

L'utilisation des technologies microbiennes dans l'industriel s'étend très rapidement par l'identification de nouvelles souches bactériennes efficaces dans les différents processus et qui présentent une jonction entre le cout faible et les meilleurs rendements. La recherche d'enzymes d'intérêt industriel notamment les enzymes hydrolytiques est un domaine de recherche très actif et promoteur.

Notre étude a été portée sur 53 isolats bactériens originaires du sol rhizosphérique des plantules d'orge commun cultivée dans la région aride d'El Ménéa et qui font partie du genre Bacillus. Elle a été fondée sur trois objectifs principaux. Le premier consistait à un criblage de l'activité enzymatique pour dix enzymes et la sélection des meilleurs isolats et les enzymes les plus produites. Le deuxième objectif a visé l'évaluation quantitative de la production d'amylase, l'optimisation de sa production et son extraction et détermination de son activité. Et enfin, la caractérisation de ces isolats.

Les 53 testés ont montré une forte capacité de production des enzymes à l'exception de la gélatinase et la nitrate réductase. Cette capacité de production a été évaluée qualitativement par une mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des colonies sur des milieux de culture sélectifs. Les enzymes Lécithinase et Protéase et Amylase ont été les plus produite par xxx isolats respectivement. Bien que l'enzyme xxx et xxx n'ont pas été produite par l'ensemble des isolats, mais une capacité de production élevée a été noté et qui arrive à 39 mm avec l'isolat B28 pour l'enzyme Protéase et 29 avec l'isolat B29 pour l'enzyme Amylase.

Le diamètre de la zone d'inhibition autour des colonies productrices d'amylase nous a conduits à choir 7 isolats considérés comme les meilleurs producteurs. L'évaluation quantitative de la production d'amylase a été réalisée à partir des colonies directement et à partir de l'extrait brut de l'enzyme. L'activité enzymatique de l'amylase a été déterminée suite à la quantité du glucose produite par la dégradation de l'amidon. Les 7 isolats retenus ont montré une production importante du glucose mais 2 isolats (B25 et B26) à partir des quel, l'extraction a été réalisé ont montré une très grande importante quantité de glucose fabriquée. Ce résultat nous a permis de constater que l'enzyme extrait est meilleur que d'utiliser la colonie directement.

La caractérisation phénotypique des 7 isolats producteurs d'amylase nous a permis de confirmer leur pureté. Elles présentaient toutes les caractéristiques des bactéries appartenant au genre Bacillus.

A l'issue de ce travail, plusieurs perspectives et recommandations semblent nécessaires à réaliser :

- Purification et caractérisation de l'amylase produit par les isolats.
- Réalisation d'une application à l'échelle industrielle.
- L'étude quantitative des autres enzymes.

Annexes

Annexe 01 : Appareillages et verreries

Appareillage	Verreries	Autre matériel
➢ Autoclave ➢ Bain marie ➢ Balance électrique ➢ Etuve ➢ Réfrigérateur ➢ Microscope optique ➢ PH-métre ➢ Plaque chauffante ➢ Vortex ➢ Spectrophotométre	➢ Becher ➢ Boite de pétri ➢ Erlenmeyer ➢ Fiole ➢ Tubes à essai ➢ Flacons ➢ Lames et lamelles	➢ Ance de platine ➢ Pipette pasteur ➢ Micro-pipette ➢ Gants jetables ➢ Bec benzen ➢ Papier aluminium, film et absorbant ➢ Portoir

Annexe 02 : Les compositions de solutions

Solution de stock glycérol à 80 % :

Glycérol	80 ml
Eau distillée	20 ml

Solution sulfate d'ammonium :

Sulfate d'ammonium	50g
Eau distillée	100ml

Solution tampon phosphate :

NaSpo4	09g
Eau distillée	1000ml

Solution NaOH :

NaOH	04g
Eau distillée	100ml

Solution d'urée

Urée	4g
Eau distillée	100ml

TSB	
TSB	3g
Eau distillée	1000ml
Acide sulfirique	
Acide sulfirique	5.4ml
Eau distillée	100ml
Cristal violet	
Violet de gentiane	1g
Acide phénique	2g
Alcoolà 95%	10ml
Eau distillé	100ml
Lugol	
I2	1g
KI	2g
Alcool à 95%	10ml
Eau distillée	100ml
Fuchsine	
Fuchsine basique	1g
Acide phénique	5g
Alcool à 95%	10ml
Eau distillée	100ml

Annexe 03 : Préparation et composition des milieux de cultures pour 1litre

Technique de préparation :

Pour chacun des milieux, les ingrédients sont pesés à l'aide d'une balance de précision et déposés dans une fiole jaugée puis rajouter le volume d'eau distillée à raison de 1000 ml. Le pH est mesuré par un pH-mètre puis ajusté par l'ajout soit du KOH ou du HCl ensuite répartir dans des flacons de 250 ml et autoclavés à 115°C pendant 15 minutes, une fois refroidies (45°C), l'antifongique (Terbinafine carbohydrate) est rajouté à raison de 5ml/l à l'aide d'un micro-filtre stérile de diamètre 0.22µm.

NBRIP

Glucose	10g
Ca3(PO4)2	05g
(NH4)2SO4	0.1g
Nacl	0.2g
MgSO4.7H2O	0.25g
KCL	0.2g
Agar	15g

Milieu à base de pectine

Pectine	02g
Urée	0.05g
(NH4)2SO4	0.15g
Agar	20g

Gélose au lait

Lait écrémé poudre	05g

Milieu pour la recherche de la lécithinase(Egg-yolk agar)

Gélose nutritive	90ml
Emulsion de jaune d'œuf	10ml

Préparation de l'émulsion de jaune d'œuf

Après avoir flamber la coquille avec de l'alcool pendant 30 secondes,récupérer le jaune d'œuf et additionner 4 fois le volume en eau distillée stérile,mélanger rigoureusemet puis mettre le mélange à l'étuve pendant 2 heures à 30 C ° et ensuite au réfrigérateur pendant 24 heures.

Gélose nutritive

Peptone	15g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	02g
Chlorure de sodium	05g
Agar	20g

Gélose au Tween 80

Peptone	10g
Nacl	5g
CaCl2.2H2O	0.1g
Tween 80	
Agar	18g

TSA 1/10 à 1% Amidon

TSB	3g
Amidon	10g
Agar	15g

Milieu à base de gélatine

TSB	3g
Gélatinase	6g
Agar	15g

Milieu Carder

Na2 HPO4	6g
KH2 PO4	3g
NaCl	0.5g
NH4 Cl	1g
Extrait de levure	3g

CMC (Carboxy-Methyl-Cellulose)	5g
Agar	15g

Milieu à base de peptone

Peptone	1g
Glucose	1g
NaCl	5g
Na2HPO4	1.2g
KH2PO4	0.8g
Rouge de phénol	0.012g
Solution d'urée	50ml
Agar	15g

Milieu Mannitol Mobilité Nitrat

Hydrolysat trypsique de caséine	20g
Mannitol	15g
Rouge de phénol	0.08g
Nitrat de potassium	2g
Agar	7g

TSA 1/10

TSB	3g
Agar	15g

Rouge Congo Agar

Cœur cervelle	37g
Saccharose	50g
Rouge Congo	0.8g
Agar	10g

Annexe 04 : coloration de gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.
- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage

Rapide sur la flamme d'un bec benzen.

- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes.
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- Ajouté du lugol pendant 60 secondes.
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- Décoloré avec l'alcool 95%. Pendant 15 min.
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- Ajouter la fuschine et laisser pendant 60 secondes.
- Laver à l'eau.
- Après séchage déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à au grossissement (× 100).

Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

Annexe 05 : Dosage des sucres

Le dosage des sucres a été réalisée selon la technique suivante :

- Dans un tube vide insérer 1Ml de l'achantillon , ajouté 1 Ml de solution de phénol (5% P/V)
- Agiter au vortex.
- Ajouter 5Ml de l'acide sulfirique concentré.
- Chauffer 3min au chauffe-tube à 30 C °.
- Mettre à l'obscurité 30min.
- Lire l'absorbance à 487nm.

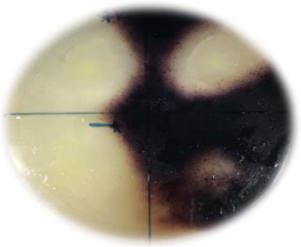
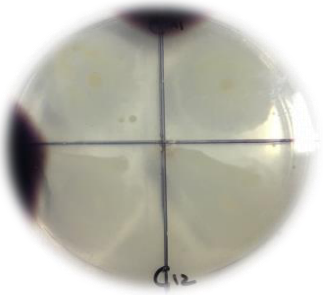
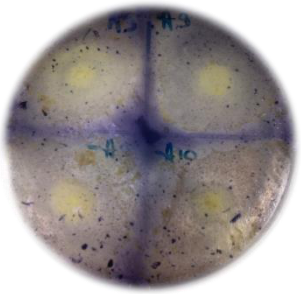
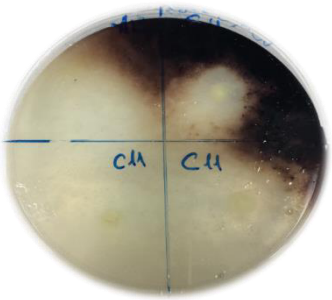
- Etablir une courbe d'étallonage avec du glucose, pour déterminer la concentration équivalente en glucose de l'échantillon étudié.

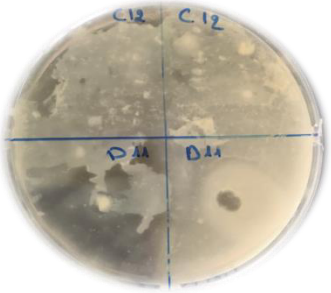
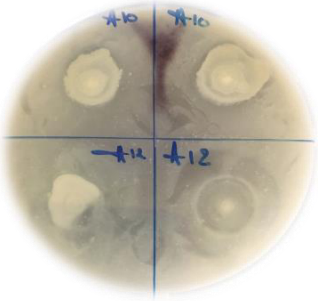
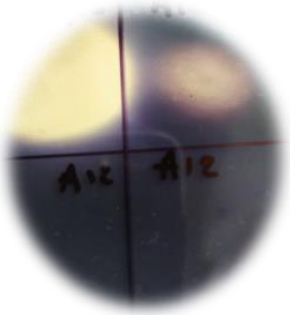
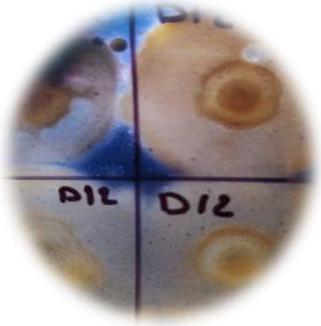
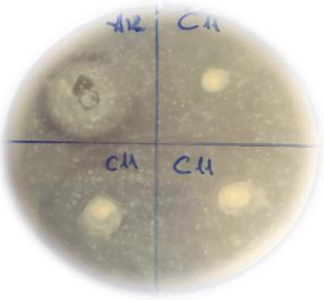
Annexe 06 : Préparation de tampon phosphate

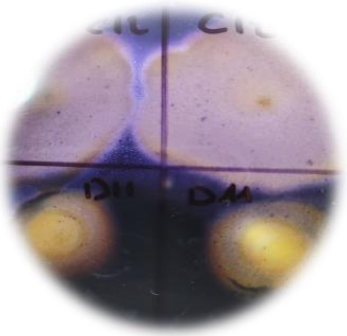
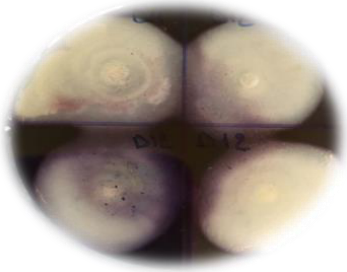
Pour préparer 100ml de tampon phosphate 0.05M à ph 7 à partir de K2HPO4.3H2O (228.23 g.mol-1) et de KH2PO4 (136.09 g.mol-1), calculer les masses des sels à dissoudre afin de préparer la solutio tampon souhaitée (pKa=7.2 à 25 c).

a) Peser précisément les masses des deux sels en utilisant une spatule propre et séche. Pour cela peser chaque sel dans du papier aluminium préalablement taré.
b) Dans un bécher ou un erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml d'eau distillée, introduire les deux sels tout en rinçant les restes sur le papier aluminium (avec la pissette d'eau distillée) dans le récipient.
c) Introduire un barreau magnétique dans le récipient et mettre sous agitation sur une plaque agitatrice jusqu'à ce que les deux sels soient complétement dissous.
d) Transvaser le contenu du récipient dans une fiole jaugée de 100ml ou une éprouvette et ajuster avec de l'eau distillée jusqu'à atteindre 100ml.
e) Faire une dernière agitation afin d'homogénéiser la solution.

Annexe 07 : Résultat d'influence des paramètres physico-chimique

Les paramètres	Influence des paramètres physico-chimique
Nacl 50	
Nacl 100	
Nacl 150	
Nacl 200	
Nacl 250	

Ph5	
Ph7	
Ph8	
Ph10	
Amidon 0.5%	

Amidon 1%	
Température 40°C	
Température 30°C	

Références bibliographiques

A

- A highly thermostable and alkaline amylase from a Bacillus sp. PN5 Biores.Technol.2007, 98 (2) ,pp. 260-265
- A. Saviozzi, R. Levi-Minzi, R. Cardelli, R. Riffaldi. A comparison of soil quality in adjacent cultivated, forest and native grassland soils. 2001. Plant and Soil volume 233, pages 251–259.
- A.Vargas, Henry Antezana, Michal Svoboda. LIPOLYTIC ENZYME PRODUCTION BY HALOPHILIC/HALOTOLERANT MICROORGANISMS ISOLATED FROM LAGUNA VERDE, BOLIVIA. 2008. Rev. Bol. Quim v.25 n.1 La Paz dic.
- Aftab Afzal, Asghari Bano. Rhizobium and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (Triticum aestivum). Int J Agric Biol 10 (1),85-88.
- Agrawal D., Patidar P., Banerjee T., Patil S. (2005). Alkaline protease production by a soil isolate of Beauveria felina under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. Proc. Biochem., 40; 1131–1136.
- Akanbi, T. O., Kamaruzaman, A. L., Abu Bakar, F., Sheikh Abdul Hamid, N., Radu, S., Abdul Manap, M. Y. and Saari, N. Highly thermostable extracellular lipase-producing Bacillus strain isolated from a Malaysian hotspring and identified using 16S rRNA gene sequencing. 2010. International Food Research Journal 17: 45-53.
- Akbache N. et Bariout S. (2007). Utilisation de planification expérimentale pour l'optimisation d'un milieu de culture à base de farine de dattes déclassées pour la production d'α-amylase de Rhizopus oryzae. Mémoire d'ingénieur, INATAA, université Mentouri, Constantine, P: 42.
- Alphones M., Jose D., ET Bernarda. (2004).Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. Ed.
- Aviron-Violet P., J.L. Baret, C. Bertrand, B. Blazy, F. Bouvier, M. Comtat, P.R.
- Aysha Jussara Ivonilde Carrim, Edweis Cândida Barbosa and José
- Azrou, Silia et Guettafi, Narimane. 2014. Recherche de caractères d'intéret agricole chez certaines bactéries rhizosphériques. Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie Microbienne. P 22.

- Azrou, Silia et Guettafi, Narimane. 2014. Recherche de caractères d'intéret agricole chez certaines bactéries rhizosphériques. Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie Microbienne.P 22.

B

- Babu K. R. et Satyanarayana T. (1993). Extracellular calcium inhibited α-amylase of Bacilluscoagulans B49. Enzyme Microbiol. Technol. 15,1066-1069
- Beevers, L. & Hageman, R. H.Nitrate reduction in higher plants. Annual Review of Plant Physiology. 1969. 20:495–522.CrossRefGoogle Scholar
- Beguin, P, Aubert, J.P. Cellulose degradation by microorganisms. 1992. Volume 3, Issue 2, Pages 91-115.
- Boulefkhad N. et Talhi A. 2018. La mise en évidence de la production de quatre enzymes (protéase, amylase, cellulase et pectinase) par des micro- organismes isolés à partir d'eau thermale et sol proche des sources thermales. Mémoire de master, Université des frères Mentouri Constantine 1, Algérie
- Božić N, Ruiz J , Lóoez-Santin J , Vujčić Z (2011). Optimization of the growth and alpha-amylase production of Bacillus subtilis IP 5832 in shake flask and laboratory fermenter batch cultures. Journal of the Serbian Chemical Society. 76 (7) 965-972.
- Božić N, Ruiz J , Lóoez-Santin J , Vujčić Z (2011). Optimization of the growth and alpha-amylase production of Bacillus subtilis IP 5832 in shake flask and laboratory fermenter batch cultures. Journal of the Serbian Chemical Society. 76 (7) 965-972.
- BY BACILLUS SP Carlos Eduardo de Souza Teodoro; Meire Lelis Leal Martins* and M.L.L.

C

- Cordeiro C. A. M., Martins M. L. L., Luciano A. B. Production and properties of α-amylase from thermophilic Bacillus sp. Braz. J. Microbiol. 2002;33(1):57–61
- Cordeiro C. A. M., Martins M. L. L., Luciano A. B. Production and properties of α-amylase from thermophilic Bacillus sp. Braz. J. Microbiol. 2002;33(1):57–61
- Coulet, P. Dupuy, J.F. Hervagault, A. Joyeau4, J. Laurent, P. Monsaq, D.
- CULTURE CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF THERMOSTABLE AMYLASE
- CULTURE CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF THERMOSTABLE AMYLASE BY BACILLUS SP Carlos Eduardo de Souza Teodoro; Meire Lelis Leal Martins* and M.L.L.

D

- Daniel Gonçalves Vieira. Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial
- Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. 2007. Volume 98, Issue 11, Pages 2082-2088.

E

- Edward A. Bayer, Raphael Lamed. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource. 1992. Biodegradation volume 3, pages 171–188.

F

- Fatoni A, Zusfahair (2012). Thermophilic amylase from Thermus sp. isolation and its potential application for bioethanol production. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 34 (5): 525-531. 11. Fooladi j, Sajjaduan A(2010). Screening the thermophilic and hyperthermophilic bacterial population of three Iranian hot-springs to detect the thermostable alpha-amylase producing strain. Iranian Journal of Microbiology.,2 (1): 49-53
- Fatoni A, Zusfahair (2012). Thermophilic amylase from Thermus sp. isolation and its potential application for bioethanol production. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 34 (5): 525-531. 11. Fooladi j, Sajjaduan A(2010). Screening the thermophilic and hyperthermophilic bacterial population of three Iranian hot-springs to detect the thermostable alpha-amylase producing strain. Iranian Journal of Microbiology.,2 (1): 49-53
- FEMS Microbiology Reviews, Volume 13, Issue 1, Pages 25–58
- Fickers, Patrick, Destain, Jacqueline, Thonart, Philipp. Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. In Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 2008. 12 (2), p. 119-130.
- Fickers, Patrick, Destain, Jacqueline, Thonart, Philipp. Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. In Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 2008. 12 (2), p. 119-130.
- Frédéric Beisson , NatalieFerté , SégolèneBrule , RobertVoultoury , RobertVerger , VincentArondel. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids Volume 1531, Issues 1–2, 30 March 2001, Pages 47-58

G

- G. Antranikian. Extremophiles and Biotechnology. 2009.

- Goldstein AH. Bioprocessing of rock phosphate ore: essential technical considerations for the development of a successful commercial technology. 2000.
- Gordon, R., Haynes, W., Pang, C., and Smith, N. (1973). The Genus Bacillus. Washington, DC: United States Department of Agriculture, 109–126.

H

- H L Mobley, M D island. Molecular biology of microbial ureases, 1995, ASM Journals/ Microbiological reviews,vol 59, No 3.
- H. Ariffin , N. Abdullah , M.S. Umi Kalsom , Y. Shirai and M.A. Hassan1,PRODUCTION AND CHARACTERISATION OF CELLULASE BY BACILLUS PUMILUS EB3 International Journal of Engineering and Technology, Vol. 3, No. 1, 2006, pp. 47-53
- Hassan Etesami, Sina M Adl. Can interaction between silicon and non–rhizobial bacteria help in improving nodulation and nitrogen fixation in salinity–stressed legumes? 2020. Rhizosphere 15, 100229.
- Hassan Etesami, Sina M Adl. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and their action mechanisms in availability of nutrients to plants. 2020.Phyto- Microbiome in stress regulation, 147-203.
- HildaRodríguez, ReynaldoFraga. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. 1999. Biotechnology Advances, Volume 17, Issues 4–5, Pages 319-339.
- https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000391.pub2.

I

- Isolates of Jacaranda decurrens Cham. (Carobinha-do-campo), BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY An International Journal Vol.49, n. 3 : pp. 353-359, May 2006 ISSN 1516-8913 Printed in Brazil.

J

- J Kevin Vessey. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. 2003.
- J. Parrado, B. Rodriguez-Morgado, M. Tejada, T. Hernandez, C. Garcia. Proteomic analysis of enzyme production by Bacillus licheniformis using different feather wastes as the sole fermentation media Enzym. Microb. Technol.2014, 57,pp. 1-7
- Jon J. Michnovicz, Herman Adlercreutz, H. Leon Bradlow. Changes in Levels of Urinary Estrogen Metabolites After Oral Indole-3-Carbinol Treatment in Humans,

JNCI: Journal of the National Cancer Institute, Volume 89, Issue 10, 21 May 1997, Pages 718–723

K

- KVBR Tilak, N Ranganayaki, C Manoharachari. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and Rhizobium on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (Cajanus cajan). 2006. European Journal of Soil Science 57 (1), 67-71.

L

- Lane, H. C., Thompson, A. C., Hesketh, J. D. & Sloane, C. Some observations on nitrate reduction in cotton. In Proceedings Beltwide Cotton Production Research Conference. 1975. 50–51.Google Scholar
- Lars G. Ljungdahl, Karl-Erik Eriksson. Ecology of Microbial Cellulose Degradation.1985. Advances in Microbial Ecology pp 237–299

M

- M. Olivera, N. Tejera, C. Iribarne, A. Ocaña, C. Lluch. Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (Phaseolus vulgaris): effect of phosphorus. 2004. https://doi.org/10.1111/j.0031- 9317.2004.00355.x.
- M., Guiraud J.P., Richard, H., Steenbrugge, H., Teoule, E., Thomas, D. et
- M.A.Amoozegar, S.Asad, A.A.Pourbabaee, M.N.Sarbolouki, S.M.M.Dastgheib.
- Mansour, F. A. Aldesuquy, H. S. Hamedo, H. A. Studies On Plant Growth Regulators And Enzymes Production By Some Bacteria. 1994. Qatar Univ. Sci. J, 14 (2): 281-288.
- Martins Brazilian Journal of Microbiology (2000) 31:298-302 ISSN 1517-8382
- Martins Brazilian Journal of Microbiology (2000) 31:298-302 ISSN 1517-8382
- Miranda L Maki, Michael Broere, Kam Tin Leung, Wensheng Qin. Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. 2011. Int J Biochem Mol Biol. 2(2): 146–154.

N

- Nautiyal, C.S. An Efficient Microbiological Growth Medium for Screening Phosphate Solubilizing Microorganisms. Federation of European Microbiological Societies. 1999. (FEMS), 170, 265-270. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x.

- Ningthoujam, Debananda S, Pintubala Kshetri, Suchitra Sanasam and Salam Nimaichand. Screening, Identification of Best Producers and Optimization of Extracellular Proteases from Moderately Halophilic Alkalithermotolerant Indigenous Actinomycetes. 2009. World Applied Sciences Journal 7 (7): 907-916.

P

- Pandey, A.; Nigam, P.; Soccol, C.R.; Soccol, V.T.; Singh, D. and Mohan, R.(2000a). Advances in microbial amylases, Biotechnology and Applied Biochemistry, 31: 135 –152
- Pandey, A.; Nigam, P.; Soccol, C.R.; Soccol, V.T.; Singh, D. and Mohan, R. (2000a). Advances in microbial amylases, Biotechnology and Applied Biochemistry,31: 135 –152
- Paula García-Fraile, Esther Menéndez, Raúl Rivas. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. 2015.AIMS Bioengineering 2 (3), 183-205.
- PETIT J. et JOBIN P., 2005, La fertilisation organique des cultures. FABQ, Québec,49p.
- Pierre Béguin, Jean-Paul Aubert. The biological degradation of cellulose. 1994.
- Plant and soil 255 (2), 571-586.
- Pooja Arora, Rakesh Yadav, Neeraj Dilbaghi, Ashok Chaudhury. Biological Nitrogen Fixation: Host-Rhizobium Interaction. 2012. Frontiers on Recent Developments in Plant Science 1, 39-59.
- Pratibha Prashar, Neera Kapoor, Sarita Sachdeva. Biocontrol of plant pathogens using plant growth promoting bacteria. 2013. Sustainable agriculture reviews, 319-360.
- Priyanka Parmar, SS Sindhu. Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. 2013.J Microbiol Res 3 (1), 25-31
- Proceedings of the 4th International Fertilizer Association Technical Conference. IFA,Paris.

R

- Ranveer Singh Jayani, Shivalika Saxena, ReenaGupta. Microbial pectinolytic enzymes. Process Biochemistry. 2005. Volume 40, Issue 9, Pages 2931-2944.

- Reyed RM (2007). Biosynthesis and properties of extracellular amylase by encapsulation Bifidobatrium bifidum in batch culture. Australian Jour nal of Basic and Applied Sciences. 1 (1): 7-14.

S

- S. Camastra, A. Gastaldelli, A. Mari, S. Bonuccelli, G. Scartabelli, S. Frascerra, S. Baldi, M. Nannipieri, E. Rebelos, M. Anselmino, E. Muscelli & E. Ferrannini . Early and longer term effects of gastric bypass surgery on tissue-specific insulin sensitivity and beta cell function in morbidly obese patients with and without type 2 diabetes Diabetologia volume 54, pages2093–2102 (2011)
- Salwa Elamin Ibrahim1 , Hassan Beshir El Amin2 , Elmutaz Nasir Hassan3 , Abdel Moneim Elhadi Sulieman3. Amylase Production on Solid State Fermentation by Bacillus Spp. Food and Public Health 2012, 2(1): 30-35 DOI: 10.5923/j.fph.20120201.06
- Salwa Elamin Ibrahim1 , Hassan Beshir El Amin2 , Elmutaz Nasir Hassan,Abdel Moneim Elhadi Sulieman3. Amylase Production on Solid State Fermentation by Bacillus Spp. Food and Public Health 2012, 2(1): 30-35 DOI: 10.5923/j.fph.20120201.06
- Subramani Ramesh, Narayanasamy Mathivanan. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. 2009. World Journal of Microbiology and Biotechnology volume 25, pages 2103–2111.

T

- Thomas, P. Sicard et G.M.A. Van Beynum (1982). Les enzymes. Prùrction et
- Tripti Sharma, Ingo Dreyer, Janin Riedelsberger. The role of K+ channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant Arabidopsis thaliana. 2013.Frontiers in plant science 4, 224.

U

- utilistion inùtstrielles. Durand G. et P. Monsan (eds), Bordas, Paris, France, 349p

V

- Vandecasteele, J.P. (1993). Biotechnologies. 4ièn'" ed., Scriban R. (éd), Technique et Documentation LavoisieE Paris, France, 904
- Vijay Singh Meena, Bihari Ram Maurya, Jai Prakash Verma, Abhinav Aeron, Ashok Kumar, Kangmin Kim, Vivek K Bajpai. Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR):

isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. 2015.Ecological Engineering 81, 340-347.

- Volker Römheld, Ernest A Kirkby. Research on potassium in agriculture: needs and prospects.2010. Plant and soil 335 (1), 155-180.

W

- W. H. Campbell. Structure and function of eukaryotic NAD(P)H:nitrate reductase.2001. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS volume 58, pages 194–204.
- Wen-Jing Lu, Hong-Tao Wang, Shi-Jian Yang, Zhi-Chao Wang , Yong-Feng Nie. Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co- composting system. 2005. Volume 51, No 6, page 353-360.
- Wolters Kluwer, France 430 p. Amaud A., Berset C., Bocquet J., Bouix M., Cerisie

Y

- Y. Elad A. Kapat The Role of Trichoderma harzianum Protease in the Biocontrol of Botrytis cinerea European Journal of Plant Pathology volume 105, pages177–189 (1999). Mariana Niño de Guzmán,Virginia
- Y., Cuvellier EG.F., De Nettancourt D., Engasser J.M., GaW P., Goursaud J., Cnrenini
- YANGZhi-xin , LIUShu-qing, ZHENG, Da-wei FENG, Sheng-dong. Effects of cadium, zinc and lead on soil enzyme activities. 2006. Journal of Environmental Sciences, Volume 18, Issue 6, Pages 1135-1141.