



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :

ELHADI Rabiaa

Le : samedi 08 juillet 2019

Thème

**Isolement et sélection d'une souche bactérienne
productrice de cellulases à partir des excréments d'un
dromadaire (*Camelus dromedarius*) (Biskra)**

Jury :

Mme. ABSI Rima	MAA	Université de Biskra	Président
M. HEBAL Hakim	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
M. AMAIRI Toufik	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018-2019

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Allah pour tout puissant de m'avoir donné le courage, la santé et la patience pour achever ce travail.

Je tiens à remercier ma famille mais surtout, de tout mon cœur, mes parents pour votre soutien et pour vos encouragements qui ont été indispensables pour mener à bien ce travail.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect à mon encadreur **Dr. Hebal Hakim**, pour sa patience, sa rigueur et ses précieux conseils qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail.

Mes remerciements sont adressés aux membres de jury qui ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail.

Merci à tous, spécialement : SAMIHA , IMANE ,selma , khawela , nedjla , firouz, djoumana , merieme ,ryanne , zahra pour tous ces bons moments passés ensemble pour oublier la fatigue et les difficultés et de nous recharger avec de l'énergie positive pour compléter ce travail, et je tien grand remercie pour ahmed salem et mohamed amine .

également toute l'équipe du Laboratoire de biologie et particulièrement naim et mouhssin pour leur disponibilité, leur amabilité ainsi que pour leur aide scientifique.

Enfin, ma reconnaissance et mes remerciements vont à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail : à

Mes chers parents, ma raison de vie (maman)

Mes frères : HANAFI Ahmed Samati ,Mehdi et Youcef

Mes sœurs : Sahra Awicha

Ma belle famille : Fatima, Haifa, Siraj; Noufel; Amina Abderahmenne ,Mohamed,

Zaki,Ayoub, Mayar, Loudjen Djamila Yasmin et Nada .

A tous mes professeurs :

*Leur générosité et leur soutien m'oblige de leurs témoigner mon profond
respect et ma loyale considération.*

A tous mes amis et mes collègues :

Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie.

A tous ceux qui m'aiment.

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
introduction	01

Chapitre 01 : Synthèse Bibliographique

1. Matière lignocellulosique	03
1.1. Définition de la matière lignocellulosique	03
1.1.1 Hémicellulose	03
1.1.2 Lignine	03
1.1.3 Cellulose	03
1.2. cellulose et cellulase	04
1.2.1. Structure de la cellulose	04
1.2.1.1. Structure chimique et répartition de la cellulose	04
1.2.2. Dérivés de la cellulose	05
1.2.2.1. Carboxyméthyl cellulose	05
1.2.2.2 Cellulose microcristalline (Avicel)	05
1.3. Enzymes cellulolytiques	06
1.3.1. Définition	06
1.4. Mode d'action	06
1.4.1. Endo-1,4- β -glucanases	06
1.4.2. Exo-1,4- β -D-glucanases	06
1.4.3. β -glucosidases	06
1.5. Les différentes origines de la cellulase	07
1.5.1. Origine animale	07
1.5.2. Origine végétale	07
1.5.3. Origine microbienne	08

1.6. Etude des microorganismes cellulolytiques	08
1.6.1 Microorganismes prokaryotes.....	08
1.6.1.1.Bactérie cellulosique.....	08
1.7. Applications biotechnologiques des enzymes cellulolytiques	10
1.7.1. Industries alimentaires.....	10
1.7.2. Pâte et papier.....	10
1.7. 3.Bioéthanol	10
1.7. 4.Domaine thérapeutique.....	11
Chapitre 02 : Matériels et méthodes	
2. Echantillonnage	12
2.1. Isolement et sélection des souches cellulolytique	12
2.1.1. L'enrichissement.....	12
2.1.2. Isolement sélection sur milieu de culture solide.....	12
2.1.3 Sélection sur milieu de culture liquide.....	13
2.2. Mesure de l'activité enzymatique	13
2.3. Identification de la souche sélectionnée.....	14
2.3. 1. Tests morphologiques.....	14
2.3.1.1. Observation macroscopique.....	14
2.3. 1.2. Mobilité.....	14
2.2. Coloration de gram	15
2.3. La coloration des Spores	15
2.4. Test biochimiques	15
2.4.1. Test de catalase.....	15
2.4.2. Oxydas.....	15
2.4.3. Réduction des nitrates en nitrites.....	15
2.4.4. Uréase.....	16
2.5. Tests physiologiques	16
2.5.1.Type respiratoire.....	16
2.5.2.Voies fermentaire.....	16
2.5.3.Réaction de Voges-Proskau.....	16
2.5.4. Réaction au rouge de méthyle.....	17
2.5.5. Production d'indole.....	17
2.5.6. Le milieu TSI (Triple Sugar Iron)	17

2.5.7. Production de sulfure d'hydrogène	17
2.5.8. Utilisation du citrate de Simonne.....	17
2.5.9. Fermentation du glucose.....	18
2.5.10. Oxydation des glucide.....	18
2.6. Températures de croissance.....	18
2.7.pH de croissance.....	18
2.8. Croissance à différentes concentrations de NaCl.....	18

Chapitre 3: résultats et discussion

3. Isolement et sélection de souches cellulolytiques.....	19
3.1. Enrichissement.....	19
3.2. Isolement et sélection de souches cellulolytiques sur milieu solide.....	19
3.3. Sélection sur milieu de culture liquide.....	20
3.4. Identification des souches.....	21
3.4. 1.Observations macroscopiques.....	21
3.4.2.Observation microscopique.....	21
3. 4.3. La coloration de Gram.....	22
3.4.5. La coloration des spores.....	22
3.5. Tests biochimiques.....	22
3.5.1. Test de catalase.....	22
3.5.2. Test d'oxydase.....	23
3.5. 3. Réduction des nitrates.....	23
3.5.4 Uréase	24
3.6 Tests physiologiques.....	24
3.6.1 Type respiratoire.....	24
3.7. Voies fermentaires.....	25
3.7.1 Réaction de Voges-Proskaue.....	25
3.7.2. Réaction au rouge de méthyle.....	26
3.7.3. Production d'indole.....	26
3.7.4. Le milieu TSI (Triple Sugar Iron)	27
3.7.5. Production de sulfure d'hydrogène.....	27
3.7.6. Utilisation du citrate de Simmons.....	28
3.7.7. Fermentation du glucose.....	28
3.7.8. Oxydation des glucides.....	29

3.8. Températures de croissance	29
3.9. pH de croissance	30
3.10. Croissance à différentes concentrations de NaCl	30
Conclusion	33
Référence bibliographique	34
Annexes	
Résumés	

Liste des figures

Figure 1. Représentation de la matière lignocellylosique montrant la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (Eloutassi <i>et al.</i> , 2014).....	04
Figure 2. Structure moléculaire de la cellulose cellulose (KARMAKAR et RAY, 2011).....	05
Figure 3 . stratégie de dégradation de cellulose (Lakhundi <i>et al.</i> , 2015).....	07
Figure 4 . le site d'échantillonnage.....	12
Figure5: les colonies des souches productrices de cellulase sur milieu synthétique CMC.....	19
Figure 6 . Courbe d'étalonnage réalisée avec du glucose.....	21
Figure 7: Aspects macroscopiques des colonies sur le milieu solide CMC après 8 jours d'incubation.....	21
Figure 8. Observation microscopique de la souche S1 après la coloration de Gram à Gx100.....	22
Figure 9. Test de catalase (résultat positive).....	23
Figure10. Test de l'oxydase (oxydase positive).....	23
Figure 12. Test uréase (résultat positive).....	24
Figure13. Test du type respiratoire (bactérie aéro anérobie facultatif).....	25
Figure14. Résultat de Voges-Proskauer (résultat positive).....	25
Figure15. Test de rouge de méthyle (résultat positive).....	26
Figure16. Production d'indol.....	27
Figure 17. Test TSI (Résultat positive).....	27
Figure18. Test de production de H ₂ S (résultat négative).....	28
Figure19. Test d'utilisation du Citrate (résultat négative).....	28
Figure20. Test de fermentation du glucose (positive).....	29
Figure21. Test d'oxydation du glucose (négative).....	29

Liste de tableaux

Tableau I. Principaux microorganismes cellulolytiques et pseudocellulolytiques. (D'après Bagnara, 1986).....	09
Tableau II: l'activité enzymatique CMCase des souches isolée dans le milieu CMC à pH 7 et 40°C.....	20
Tableau III: Comparaison entre les caractères biochimiques et microbiologiques de la souche S1 et l'espèce <i>Micrococcus luteus</i> (Akayli, 2016).....	30

Liste des abréviations

DNS : Acide 3,5 dinitrosalicylique.

CMC : carboxyméthyle cellulose.

TSI : triple sugar Iron.

UI : unité international.

Kia : hajna –kligler.

Rpm :rotation par minute.

RM :rouge de méthyle.

Vp :voges-proskauer.

MCC : La cellulose microcristalline

Introduction

Les biocarburants occupent actuellement de plus en plus de place dans nos journaux, sites Internet ou même les débats politiques, l'idée n'est pas nouvelle. C'est en 1900 que Mr Diesel (inventeur du moteur portant le même nom) présenta lors de l'exposition universelle de Paris le premier moteur fonctionnant à l'huile végétale (Machefer, J., *et al.*, 1990) L'idée avait alors été abandonnée par manque de compétitivité avec les hydrocarbures traditionnels. En outre, avec l'augmentation du prix de pétrole et l'aggravation des émissions de gaz à effet de serre (équivalents de CO₂) justifient la recherche de matières premières et de technologies alternatives capables de réduire la dépendance en ces combustibles fossiles et de protéger l'environnement (Eloutassi *et al.*, 2014).

La biomasse lignocellulosique, constituée principalement de cellulose, d'hémicellulose et de lignine, représente aujourd'hui une des ressources renouvelables les plus abondantes sur terre. (Saidi, 2011). La cellulose, un polymère linéaire constituée d'unités de D-glucopyranose reliées par des liaisons β (1-4), constitue la première ressource en carbone et d'énergie renouvelable pratiquement inépuisable et peu exploitée à ce jour. (Voget *et al.*, 2006).

La cellulose offre les meilleures perspectives en terme de réduction des coûts de production par son abondance et son prix potentiellement inférieur aux autres substrats et ce, malgré la complexité des procédés de transformation. La cellulose constitue des enjeux importants dans la recherche notamment en matière de biocarburants. (Howard *et al.*, 2003).

Les principales enzymes capables de dégrader les celluloses sont des hydrolases appelées enzymes cellulolytiques. En raison de la complexité structurale des celluloses, leur dégradation complète implique tout un système comprenant une variété d'enzymes dont les endoglucanases, les exoglucanase et les β -glucosidases (McCarthy *et al.*, 1992).

Les cellulases montrent une large gamme d'applications dans plusieurs secteurs tels que la chimie, l'alimentation humaine et animale, les pâtes et papiers, le textile, l'automobile, l'électronique et, surtout, l'énergie (Zhang *et al.*, 2012). Toutefois, peu de cellulase sont performantes à l'échelle industrielle et leur cout de production reste très élevé. Par

conséquent, il est important de rechercher de nouvelles cellulases avec des propriétés intéressantes du point de vue industriel.

Les microorganismes est la principale source d'isolement des cellulases. Ils ont fait l'objet de nombreux travaux, en ce qui concerne la sélection des microorganismes cellulolytiques, les mutations génétiques pour l'obtention de souches hyperproductrices et les conditions de culture des microorganismes impliqués (Leghlimi, 2013).

Dans la meme optique, notre étude a pour objectif l'isolement et la sélection d'une souche microbienne productrice de cellulases et ce, en exploitant un nouveau environnement de prolifération de ces microorganisme, à savoir, les excréments du chameau.

Ce travail est dévisé en trois parties. La première partie est consacrée à la recherche bibliographique sur la biomasse lignocellulosique, les cellulases et les microorganismes cellulolytiques, La deuxième partie porte sur le matériel et méthodes et la troisième sur les résultats et discussion.

1. Matière lignocellulosique

1.1. Définition de la matière lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique (toutes les plantes et les matériaux d'origine végétale) est la matière organique la plus abondante et renouvelable sur la terre. Elle représente une grande ressource potentielle pour la production de biocarburant, parce qu'elle est largement abondante et bon marché et sa production est écologiquement rationnelle. Les composants majeurs des matériaux lignocellulosiques sont la cellulose, l'hémicellulose ainsi que la lignine (O'DONOHUE, 2013). (Figure 1).

1.1.1 Hémicellulose

C'est un polymère complexe d'hydrate de carbone et représente jusqu'à 25-30% de la matière lignocellulosique. L'hémicellulose est un polysaccharide ayant un poids moléculaire inférieur à celui de la cellulose. Il est constitué de D-xylose, de D-mannose, de D-galactose, de D-glucose, de L-arabinose, de 4-O-méthyl-glucuronique, de D-galacturonique et d'acide D-glucuronique. Les sucres sont reliés entre eux par des liaisons β -1,4- et parfois β -1,3-glucosidiques (Wong *et al.*, 1988).

1.1.2 Lignine

A côté de la cellulose, c'est un polymère aromatique le plus abondant dans la nature. Elle est présente dans la paroi cellulaire de la cellule. Structurellement, la lignine est un hétéropolymère amorphe, constitué de composés phénylpropanoïdes (Saha et Bothast, 1997).

1.1.3 Cellulose

La cellulose est la molécule organique renouvelable la plus abondante sur terre, Elle représente plus de la moitié de la biomasse terrestre et constitue un réservoir de carbone sous forme organique à l'échelle de la planète.. La cellulose est un homopolymère linéaire et insoluble forme d'unités D-glucopyranose liées entre elles par des liaisons de type glycosidique β -(1 \rightarrow 4). Le cellobiose (dimère de glucose) est le motif répétitif de la cellulose et donc l'unité structurale de base de la cellulose. (FONTY et DURAN, 2007)

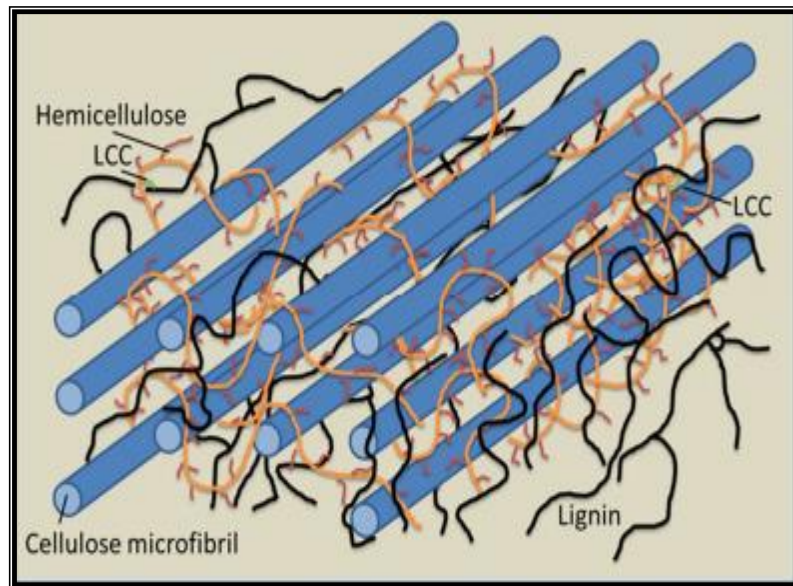


Figure 1. Représentation de la matière lignocellulosique montrant la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (Eloutassi *et al.*, 2014).

1.2. cellulose et cellulase

1.2.1. Structure de la cellulose

1.2.1.1. Structure chimique et répartition de la cellulose

La cellulose est une fibre, insoluble et un polysaccharide cristallin. Il est un constituant Majeur des polysaccharides des parois cellulaires végétales, composé des motifs répétés de Dglucose lié par β -1,4-glucosidiques est de la cellobiose (figure 2) (Malherbe et Cloete, 2002).

Les molécules de cellulose sont très variables en ce qui concerne la longueur du polymère, à savoir, le degré de polymérisation (Ieolovich, 2008). Ces chaînes complètement linéaires les chaînes sont orientées en un assemblage cristallin stabilisé par des liaisons faibles de types hydrogène intra- et inter chaînes (Res *et al.*, 2006).

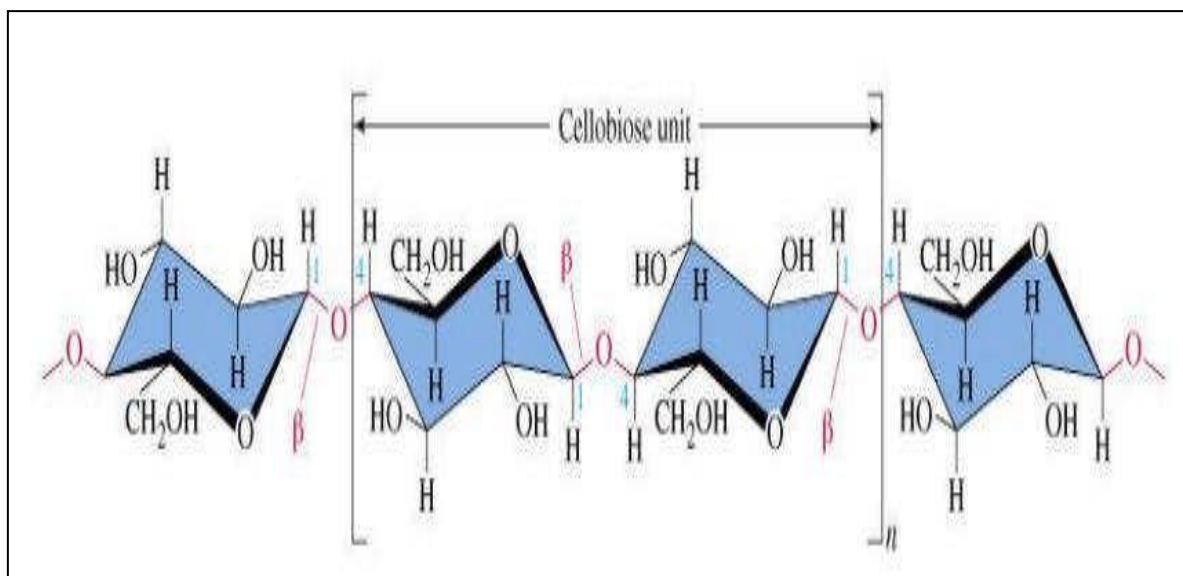


Figure 2. Structure moléculaire de la cellulose cellulose (KARMAKAR et RAY, 2011).

1.2.2. Dérivés de la cellulose

Les dérivés cellulosiques ont montré des propriétés spécifiques intéressantes pour de nombreuses industries (Captant, 1967). parmi lesquelles :

1.2.2.1. Carboxymethyl cellulose

La Carboxymethyl cellulose de sodium est généralement obtenue par réaction de la cellulose pure avec l'acide monochloracétique et/ou le monochloracétate de sodium en présence de soude caustique. Elle est presque toujours vendue sous le nom de sel de sodium (Na CMC). Il est habituellement indiqué simplement comme carboxymethyl cellulose (CMC). Elle est caractérisée par une teneur en matière active et également par le degré d'éthérisation ou degré de substitution. Elle se dissout aisément dans l'eau froide et dans l'eau chaude, Une troisième caractéristique de la Carboxyméthyl cellulose de sodium est, bien entendu, sa viscosité, qui sera fonction en premier lieu du degré de polymérisation de la matière première et en second lieu des dégradations qui interviennent au cours de sa fabrication (Captant, 1967).

1.2.2.2 Cellulose microcristalline (Avicel)

La cellulose microcristalline (MCC) a été découverte en 1955 par Battista et Smith et a été commercialisée la première fois sous la marque avicel. La MCC est une cellulose épurée et partiellement dépolymérisée préparée en traitant l'alpha cellulose, obtenue comme pulpe de matière végétale fibreuse, avec des acides minéraux (HCl) (Thoorens *et al.*, 2014).

1.3. Enzymes cellulolytiques

1.3.1. Définition

De nombreux micro-organismes, principalement les mycètes et les bactéries dégradent la cellulose et d'autres fibres de la paroi cellulaire végétale. Dans la nature, la dégradation de la biomasse cellulosique est effectuée par un système d'enzymes hydrolytiques collectivement appelées cellulases (Dashtban *et al.*, 2010). Ce système comprend trois types d'enzymes : les endo-1-4- β -glucanases (CMCases), les cellobiohydrolases ou les exoglucanases (avicelase), et les β -glucosidases, qui agissent de manière synergique dans l'hydrolyse de la cellulose (Bajaj *et al.*, 2013).

Ces enzymes hydrolysent les liaisons β -1,4 dans les chaînes de cellulose et leur action aboutit à la libération du glucose. Elles sont les principaux membres de la famille des glycosides hydrolases et sont produites par des mycètes, des bactéries, des protozoaires, des plantes et des animaux (Menendez *et al.*, 2015).

1.4. Mode d'action

Les cellulases sont maintenant classées selon leur structure, comme toutes les enzymes agissant sur les sucres. Il existe trois types d'activités enzymatiques cellulolytiques complémentaires pour l'hydrolyse totale de la cellulose (Acharya et Chaudhary., 2012).

1.4.1. Endo-1,4- β -glucanases

Ces endoglucanases (EG) attaquent au hasard les liaisons Oglycosidiques internes donnant ainsi des chaînes glucanes de différentes longueurs.

1.4.2. Exo-1,4- β -D-glucanases

Agissent sur les extrémités de la chaîne de la cellulose et libèrent le β -cellobiose comme produit final.

1.4.3. β -glucosidases

Douées d'une action spécifique sur les disaccharides « β -cellobiose » et produisent le glucose.

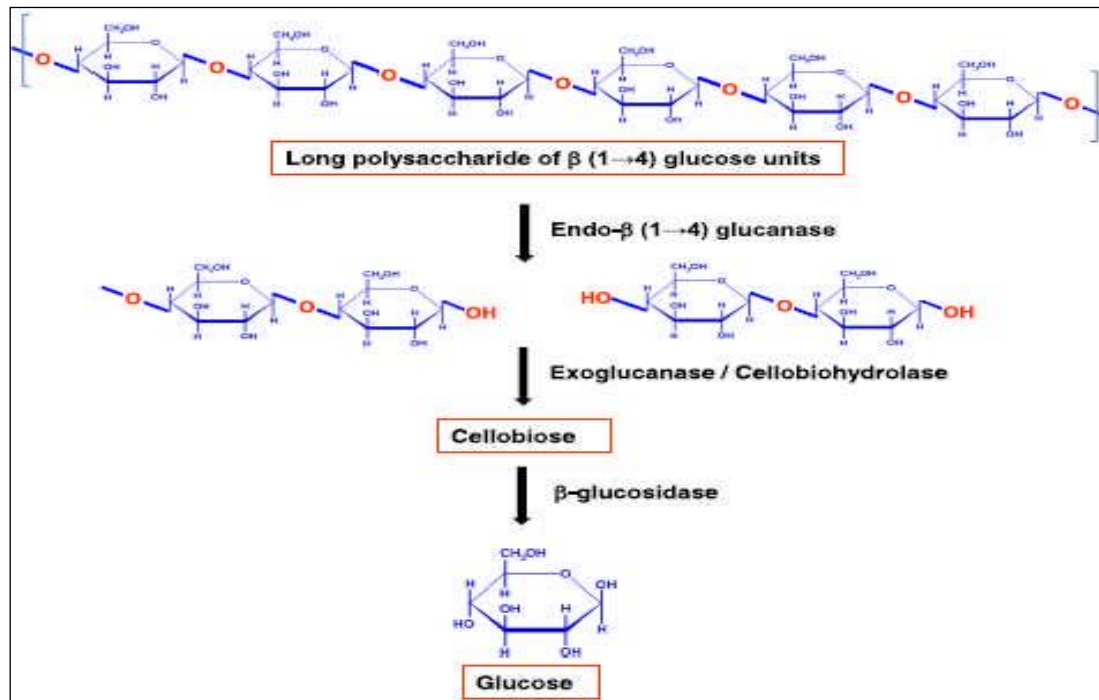


Figure 3 . stratégie de dégradation de cellulose (Lakhundi *et al.*, 2015)

1.5. Les différentes origines de la cellulase

Les cellulases sont largement répandues dans la nature. Elles sont recensées chez des organismes très divers : bactéries, champignons, plantes, protozoaires, vers, , insectes mollusques etc...(Odier et Rouau., 1985). De ce fait, les cellulases peuvent avoir plusieurs origines : animale, végétale ou microbienne.

1.5.1. Origine animale

Plusieurs espèces animales (omnivores et herbivores) utilisent la cellulose comme source d'énergie, malgré leur incapacité à produire des cellulases endogènes, mais ceci est dû à une vie symbiotique des microorganismes dans leur système digestif. Ainsi, peu de cellulases endogènes ont été décrites chez des organismes supérieurs (Clementi ,1922).

1.5.2. Origine végétale

Les cellulases jouent un rôle important dans la maturation des fruits où elles participent à la libération des arômes (Cordonnier *et al.*, 1986). Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des fruits tels que les grains de raisin, les amandes douces de l'avocat *Persea americana* (Combo ,2011).

1.5.3. Origine microbienne

Les bactéries et les moisissures utilisent la cellulose pour la production de quantités substantielles d'enzymes extracellulaires qui sont alors facilement récupérées du milieu de culture après fermentation bien que ces enzymes, peuvent être présentes sur la surface des cellules Néanmoins, ce sont les cellulases bactériennes et fongiques qui ont été les plus étudiées notamment en raison de leurs utilisations potentielles en biotechnologie (Odier, 1985).

1.6. Etude des microorganismes cellulolytiques

La flore cellulolytiques est très variée; elle se retrouve dans des écosystèmes divers constitués par les composts, les fumiers, les litières, les boues d'estuaires, le fond des lacs et le tractus digestif des animaux. Ces microorganismes appartiennent à des groupes taxonomiques très variés pouvant être groupés suivant leur appartenance au groupe Eucaryotes ou Procaryotes, leur température de croissance qui permet de distinguer les microorganismes mésophiles et les microorganismes thermophiles, et enfin suivant leur comportement vis-à-vis de l'oxygène (**Tableau I**) (Tchunden, 1990).

1.6.1 Microorganismes prokaryotes

Ce groupe comprend les bactéries cellulolytiques et pseudocellulolytiques. Suivant le mode de respiration, on distingue les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aérobies-anaérobies facultatives.

V.6.1.1. Bactérie cellulosique

Les bactéries sont moins étudiées que les champignons. Cependant certaines d'entre elles ont fait l'objet de nombreux travaux **Tableau I**.

Clostridium thermocellum est la bactérie cellulolytique la mieux connue et la plus étudiée; elle permet la conversion directe de la cellulose en éthanol, en acides organiques et en gaz (CO₂, H₂). C'est l'une des rares bactéries qui produit des cellulases aussi efficaces dans l'hydrolyse de la cellulose cristalline (Johnson *et al.*, 1982) que les cellulases de *Trichoderma reesei*. *Cl. thermocellum* est une bactérie anaérobie saprophyte. Son système enzymatique est très étudié. Les cellulases secrétées par cette bactérie ont tendance à s'associer en un complexe de haute masse molaire (2 millions de daltons) appelé cellulosome (Lamed *et al.*,

1983) composé d'au moins 14-18 polypeptides de masse molaire comprise entre 48 000 et 210000 daltons.

Tableau I. Principaux microorganismes cellulolytiques et pseudocellulolytiques. (D'après Bagnara, 1986)

Organisme	Température de croissance	Métabolisme énergétique
Les prokaryote	M	Ae
<i>Pseudomonadaceae</i>	M	Ae
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M	Ae
<i>Cellvibrio gilvus</i>	M	Ae
<i>Cellvibrio fulvus</i>	M	Ae
<i>Cellvibrio vulgaris</i>	M	Ae
<i>Cellvibrio mixtus</i>	M	Ae
<i>Bacteroidaceae</i>	M	Ae
<i>Bactroides succinogenes</i>	M	An
<i>Bacteroides cellulosolvens</i>	M	An
<i>Butyvibrio fibrisolvens</i>	M	An
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	M	An
<i>Acetivibrio cellulosolvens</i>	M	An
Bacillaceae	M	An
<i>Bacillus circulans</i>	M	Ae/ An
<i>Bacillus coagulans</i>	M	fac

<i>Bacillus laterosporus</i>	M	Ae/ An
<i>Bacillus licheniformis</i>	M	fac
<i>Clostridium aldrichii</i>	M	Ae/An
<i>Clostridium C7</i>	M	fac

M: mésophile, T: thermophile, M/Tt: mésophile thermotolérant, Ae: aérobie, An: anaérobie, Ae/An fac: aérobie, anaérobie facultative.

1.7. Applications biotechnologiques des enzymes *cellulolytiques* :

L'étude des différentes voies de valorisations des biomasses lignocellulosique a fait l'objet de nombreux travaux. Outre la fabrication de la pâte à papier, les matières lignocellulosiques présentent un intérêt dans l'alimentation humaine et animale ainsi qu'en tant que précurseurs pour la production de produits chimiques organiques et d'énergie.

1.7.1. Industries alimentaires

En industrie agro-alimentaire, les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration des diverses suspensions riches en fibres celluloses manipulées par ce type d'industrie. Les cellulases sont employées avec d'autres enzymes dégradant la paroi végétale, dans le traitement des fruits et de légumes et dans l'industrie des boissons. (Scriban, 1993).

1.7.2. Pâte et papier

Dans la fabrication des pâtes et papier les cellulases sont employés dans le nettoyage des encres du papier aux cours du recyclage, dans la préparation du carton facilement biodégradable et les papiers doux (Scriban, 1999).

1.7. 3. Bioéthanol

La bioconversion industrielle de la matière lignocellulosique en éthanol se produit en plusieurs étapes. Après des prétraitement physicochimiques, les enzymes sont ajoutés pour hydrolyser les polysaccharides en sucres simples (saccharification), puis, dans une étape supplémentaire, des micro-organismes capables de fermentation sont ajoutés pour fermenter les sucres en bioéthanol (Maki et *al.*, 2009).

1.7. 4. Domaine thérapeutique

L'utilisation quasi confidentielle de certaines cellulases dans des formules médicamenteuses à vocation d'aide digestive (Odier, 1985) Ainsi, des cellulases de *Trichoderma viride* sont utilisées en association avec des α -amylases fongiques, pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales (Rivière, 1975).

2. Echantillonnage

Des échantillons d'excréments de chameau (figure 4) sont prélevés durant le 26 Novembre 2018, avec spatule stérile, et introduit dans un flacon stérile et stockés à 4°C. la conservation) 4°C permet de préserver la flore microbienne de l'échantillon.



Figure 4 .le site d'échantillonnage

2.1. Isolement et sélection des souches cellulolytique

2.1.1. L'enrichissement

Les excréments de chameau contiennent de la matière lignocellulosique partiellement dégradée. Ils sont par conséquent propices à la croissance des souches cellulolytiques. Toutefois, afin d'augmenter les chances de les isoler, une étape d'enrichissement a été effectuée en présence de CMC, une cellulose plus facile à dégrader que la cellulose naturelle.

Devant le bec bensen, les échantillons sont bien mélangés et 10g sont pesés et introduits dans 100 ml de milieu d'enrichissement à base de CMC. Ce milieu contient en g/l : 1g de CMC, 0.5g de NH_4Cl , 0.25 g de NaCl , 0.5g de Na_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Il est ajusté à pH 7 à l'aide d'une solution de NaOH (1M). La suspension est bien mélangée puis incubée à 40°C pendant 15 jours.

2.1.2. Isolement sélection sur milieu de culture solide

Une série de dilutions jusqu'à 10^{-6} est réalisée sur le milieu d'enrichissement. 1 ml de chaque dilution est ajouté à 9ml d'eau distillée.

Des boîtes de Pétri contenant le même milieu de culture solide (15g Agar-Agar) à base de CMC sontensemencés en surface par 0,1 ml des différentes dilutions, puis incubés à 40°C jusqu'à apparition des colonies, Les souche sont sélectionnées sur la base de la foramtion de zone claire des colonie .

les souches sélectionnées sur le milieu solide sont purifiées par repiquage sur le même milieu et incubées à 40°C pendant 48 h.

Les souches purifiées sont par la ensuite transférées dans des géloses inclinées nutritives et conservées à 4°C.

2.1.3 Sélection sur milieu de culture liquide

Cette sélection est basée sur la mesure de l'activité cellulase (CMCase) du surnageant d'une culture sur milieu liquide.

Les souches isolées sontensemencées dans des tubes contenant 7mL de milieu liquide à base de CMC, puis incubées à 40°C pendant 48h. Après deux jours de croissance, la culture du milieu liquide a été centrifugée à 10000 rpm à 4° C pendant 10 minutes, afin de récupérer le surnageant de la culture.

2.2. Mesure de l'activité enzymatique

L'activité cellulase a été déterminée en mesurant la quantité de sucres réducteurs libérés à partir d'une solution 1% (p/v) de carboxymethyl cellulose (CMC) ou d'avicel suivant la méthode au DNS (L'acide 3,5-dinitrosalicylique) (Miller, 1959).

Les solutions 1% de CMC ou d'avicel sont préparées en dissolvant 1g de ces substrats dans 90 ml de tampon phosphate de sodium (annexe1) (50mM) à pH 7.

Le mélange réactionnel contient 0,1 ml de surnageant (extrait enzymatique) et 0,9 ml de la solution CMC (1%). Il est incubé à 40° C pendant 30 minutes. La réaction enzymatique est arrêtée par ajout de 1,5 ml de(DNS) (annexe2) et le mélange est porté à ébullition à 100 °C pendant 5 minutes. Le mélange est par la suite refroidi dans une eau glacée.

Le mélange témoin correspond à la solution de CMC incubée sans le surnageant, celui-ci étant ajouté après le DNS.

La lecture des absorbances est effectuée à 540 nm, au spectrophotomètre (Jenway6310).

Les courbes d'étalonnage sont réalisées avec une solution de glucose de 0,01 à 0,6 mg/ml.

La concentration des sucres réducteurs a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage, et l'activité CMC_{Casea} a été calculée d'après la relation suivante (Baily, 1992).

$$\text{Activité enzymatique (UI/ml)} = (C_x - C_{Tb}) \times D/t$$

C_x : Concentration des sucres réducteurs du mélange réactionnel (μmole/ml).

C_{Tb} : Concentration des sucres réducteurs du mélange témoin (μmole/ml).

D : facteur de dilution

T : temps d'incubation (minutes)

Une unité (U ou μmol / min) de l'activité carboxyméthyl cellulase est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une 1 μmole d'équivalente glucose par minute dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus. La mesure d'activité sur chaque souche est réalisée en triplicata.

2.3. Identification de la souche sélectionnée

2.3. 1. Tests morphologiques

2.3.1.1. Observation macroscopique

C'est la première étape qui oriente le processus d'identification des bactéries. Elle porte sur les caractères morphologiques. L'observation à l'œil nu est basée sur les éléments d'identification tel que la forme, la taille, l'opacité, l'aspect de la surface ...etc (Denis *et al.*, 2007).

2.3. 1.2. Mobilité

Cette propriété est déterminée par examen microscopique de la souche à l'état frais entre lame et lamelle ; et par observation de l'aspect de la croissance dans le milieu mannitol mobilité. Dans ce dernier cas, la souche est ensemencée par piqûre centrale jusqu'au fond du tube au moyen d'une pipette boutonnée. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 48 heures (Renaud *et al.*, 2000).

2.2. Coloration de gram

La morphologie, l'arrangement des cellules les types pariétaux des isolats sont déterminés sur des cultures jeunes par la technique de la coloration de Gram après observation par microscope optique avec un grossissement x40 et x100 (Singleton, 2005).

2.3. La coloration des Spores

La souche âgée de 24 h, 48 h et 72 h a fait l'objet d'une coloration des spores par le vert de malachite sur un frottis préparé préalablement. Puis l'ajoute des quelques gouttes de vert de malachite, flamber la lame dans le bec benzène jusqu'à l'apparition de la vapeur et laisser la refroidir. Le flambage répéter trois fois (Renaud *et al.*, 2000).

2.4. Test biochimiques

2.4.1. Test de catalase

La catalase est une enzyme respiratoire qui permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau oxygénée selon la réaction suivante $H_2O_2 \rightarrow H_2O + 1/2O_2$. Pour mettre en évidence cette enzyme, une partie de la colonie suspecte est diluée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame stérile. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase (Tabak *et al.*, 2012).

2.4.2. Oxydase

La recherche de l'oxydase est un critère les plus discriminants et les plus employés pour l'identification des bactéries, l'oxydase ou cytochrome C est le dernier accepteur d'électrons dans la chaîne respiratoire, leur rôle est de transférer les électrons vers leur dernier accepteur, soit l'oxygène ou accepteur minérale ou organique.

La recherche de cette enzyme consiste à déposer dans une lame, un disque «Ox» et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée. Ensuite, prélever une partie de la colonie à étudier et l'étaler sur le disque. Après environ 10 à 30 minutes une coloration violet foncé apparaît sur le disque puis vire au noir : test oxydase + (Tabak *et al.*, 2012).

2.4.3. Réduction des nitrates en nitrites

Le bouillon nitrate est ensemencé par une demi oïse de la culture solide. Après 24 h d'incubation à 37°C, 5 gouttes de chacun des réactifs NR1 et NR2 sont ajoutées avec

agitation. L'apparition d'une coloration rose ou rouge indique une réduction des nitrates en nitrites. Dans le cas contraire, le test est complété par l'épreuve de Zobell. Dans cette dernière, une pincée de poudre de Zinc est ajoutée au milieu, suivie d'une agitation pendant 5 min. L'apparition d'une couleur rouge brin indique la présence des nitrates, et la souche est nitrate réductase négative (Renaud et al., 2000).

2.4.4.Uréase

Un ml de milieu urée-Indole estensemencé abondamment par la culture puis incubé à 37°C pendant 48 h. La variation de la couleur du milieu de l'orange au rouge indique un test positif (Renaud *et al.*, 2000).

2.5.Tests physiologiques

2.5.1.Type respiratoire

Le comportement des souches vis-à-vis de l'oxygène a été déterminé dans la gélose viande-levure. La souche estensemencée, dans la gélose maintenue en surfusion, par piqûre centrale jusqu'au fond du tube à l'aide d'une pipette boullée. Celle-ci est remontée, par la suite, dans un mouvement en spirale, jusqu'à 1 cm de la surface du milieu. La croissance est observée après 24, 48 ou 72 h d'incubation à 37°C (Renaud *et al.* 2000).

2.5.2.Voies fermentaire

Les microorganismes diffèrent sur la base des produits terminaux qui dérivent de l'acide pyruvique durant la fermentation du glucose.

2.5.3.Réaction de Voges-Proskau

Elle met en évidence les produits de la fermentation butanediolique. Le milieu Clark et Lubs estensemencé par la souche puis incubé à 37 °C pendant 48 h. Par la suite, dans un tube à hémolyse stérile, 1 ml de la culture est additionné, dans l'ordre, de 0,5 ml d' α -naphtol (6%) et de 0,5 ml de KOH (4M). Après une légère agitation pendant 30 secondes à une minute, le tube est maintenu en position inclinée pendant 10 à 15 minutes. La présence de l'acétoïne (réaction positive) se traduit par l'apparition, dans 2 à 5 min, d'une coloration rouge en surface pouvant diffusé dans le milieu (Renaud *et al.*, 2000).

2.5.4. Réaction au rouge de méthyle

Le rouge de méthyle révèle l'acidification qui résulte des fermentations acides mixtes. Le milieu Clark et Lubs estensemencé par la souche puis incubé à 37 °C pendant 4 jours. Par la suite, 2 ml de la culture sont transvasés dans un tube à hémolyse stérile, suivi de deux gouttes de l'indicateur. Une teinte rouge franche indique une réaction positive, une teinte jaune, une réaction négative (Renaud *et al.*, 2000).

2.5.5. Production d'indole

Elle est mise en évidence dans 1 ml de milieu urée-indol et dans 5 ml d'eau peptonée exempte d'indole. Les milieux ont étéensemencés abondamment par la souche et incubés à 37°C pendant 24 h. Par la suite, cinq gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées à la culture, suivi d'une agitation. Au repos, la présence d'indole se traduit par la formation d'un anneau rouge à la surface des milieux (Renaud *et al.*, 2000).

2.5.6. Le milieu TSI (Triple Sugar Iron)

C'est un milieu différentiel par la capacité à mettre en évidence les fermentations du glucose, lactose et/ou saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré (H₂S) et de gaz. Le rouge de phénol est l'indicateur colorant virant du rouge au jaune pour un résultat positif. Le noircissement du culot indique la présence de H₂S (RENAUD *et al.*, 2000).

Le milieu utilisé est Tri- Sugar- Iron additionné 15% de NaCl. La souche estensemencée à la surface de la pente de la gélose puis par piqûre centrale du culot au moyen d'une pipette boulée, puis incubé à 40°C pendant 48 h. La fermentation du lactose se traduit par un jaunissement à la surface (Denis *et al.*, 2007).

2.5.7. Production de sulfure d'hydrogène

La souche estensemencée par piqûre centrale jusqu'au fond du milieu Hajna-kligler. Après 24 h d'incubation à 37°C, La production de sulfure d'hydrogène se traduit par la formation d'un précipité noir dans le culot (Renaud *et al.*, 2000).

2.5.8. Utilisation du citrate de Simonne

La gélose inclinée de Citrate de Christinsen estensemencée abondamment par la souche, puis incubée à 37°C pendant 48 h. L'utilisation du citrate se traduit par un virage de la couleur du milieu au bleu (Renaud *et al.*, 2000).

2.5.9. Fermentation du glucose

Le glucose est incorporé, aseptiquement, à une concentration finale de 0,5 % (v/v), au milieu MEVAG maintenu en surfusion. La souche estensemencée par piqûre centrale jusqu'au fond du tube au moyen d'une pipette boulée. Le milieu est recouvert par une couche de paraffine, puis incubé à 37°C pendant 48 h. La fermentation du glucose se traduit par un jaunissement dans tout le milieu (Renaud *et al.*, 2000).

2.5.10. Oxydation des glucide

Les milieux MEVAG additionnés des sucres sont incubés à 37°C pendant 48h. L'oxydation du glucide se manifeste par un jaunissement près de la surface du milieu (Renaud *et al.*, 2000).

2.6. Températures de croissance

L'aptitude à croître à différentes températures, à 5°C d'intervalle, est déterminée dans la gélose nutritive inclinée. Avant ensemencement, les géloses sont préincubées jusqu'à équilibre de leur température avec la température d'incubation. Les milieux ensemencés sont incubés pendant 3 jours à 55°C ou plus, 05 jours entre 30 et 50°C, 14 jours à 20°C et 25°C et 21 jours à 15°C (Claus et Berkeley, 1989).

2.7. pH de croissance

La souche est ensemencée dans 05 ml de bouillon nutritif ajusté au pH de 4 à 12 (pas de 1). Un trouble microbien est observé après 21 jours d'incubation à 30° (Claus et Berkeley, 1989).

2.8. Croissance à différentes concentrations de NaCl

Des bouillons nutritifs (3 ml) contenant 0, 2, 5, 7, 10, 12, 15, 18 et 20 g /l de NaCl sont ensemencés par la souche. Les tubes sont incubés à 30°C, en position inclinée afin de favoriser l'aération. Un trouble microbien est observé après 7 et 14 jours d'incubation (Claus et Berkeley, 1989).

Un échantillon d'excréments de dromadaire (*Camelus dromedarius*) prélevé à la commune d'Elhajeb a fait office d'une source d'isolement et de sélection de souches cellulolytiques.

3. Isolement et sélection de souches cellulolytiques

3.1. Enrichissement

L'apparition de trouble dans le milieu d'enrichissement contenant uniquement la CMC comme source de carbone, indique que ce milieu favoriserait la croissance de souche cellulolytiques contenues dans les excréments de dromadaire.

3.2. Isolement et sélection de souches cellulolytiques sur milieu solide

Au bout de 3 à 5 jours d'incubation, à 40°C et pH 7, de milieux solidesensemencés avec des dilutions du milieu d'enrichissement, plusieurs colonies sont apparues sur les boites la dilution 10^{-7} donnait des colonies bien espacées (Figure 5).

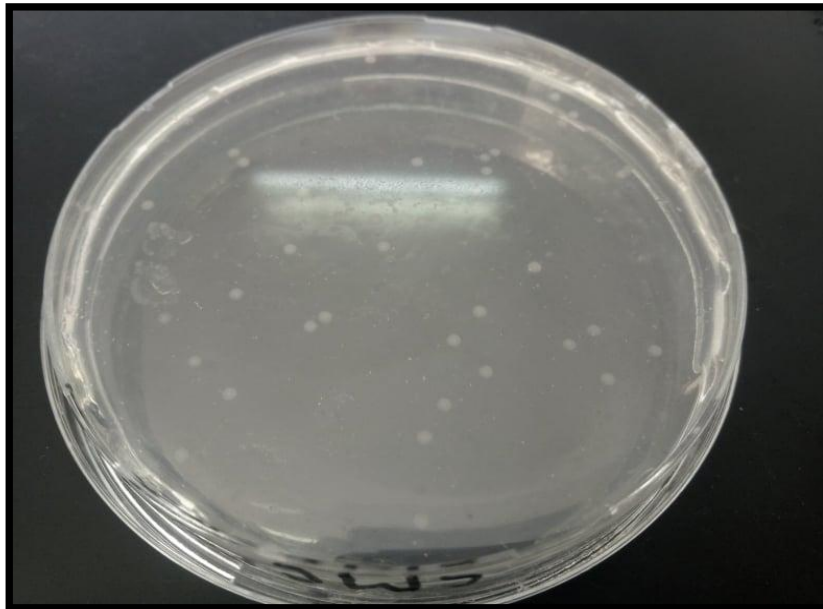


Figure5: les colonies des souches productrices de cellulase sur milieu synthétique CMC.

L'apparition de plusieurs colonies montre que l'est excrément du dromadaire est une source riche en microorganismes dégradant la cellulose. Le dromadaire présente une meilleure capacité à digérer les fourrages pauvres que les ruminants domestiques, ce qui supposerait la présence dans son système digestif de microorganismes cellulolytiques très puissants.

Parmi les souches isolées sur le milieu solide, 10 souches ont été sélectionnées sur la base de la formation d'une zone claire autour de leur colonie. Une zone claire indique une production de cellulases extracellulaires.

3. 3. Sélection sur milieu de culture liquide

La sélection sur milieu liquide est basée sur la mesure de l'activité cellulase par la méthode DNS (Miller, 1959). Les activités enzymatiques sont présentées dans le Tableau II

Le milieu synthétique utilisé pour la sélection de la souche la plus performante parmi les 10 souches préalablement sélectionnées dans le milieu CMC a permis de choisir la souche S1 pour sa grande activité cellulolytique. En effet, cette dernière possède une activité cellulolytique de 0.166 (UI/ml). Les absorbances sont transformées en activités enzymatique à l'aide d'une courbe d'étalonnage en utilisant différentes concentrations de glucose (Figure 6).

D'autres souches également, S'3, S'6 et S'5 possède une grande activité enzymatique 0,216, 0,2045, 0,18775 (UI/ml) respectivement..

Tableau II. l'activité enzymatique CMCase des souches isolée dans le milieu CMC à pH 7 et 40°C.

Souche	pH	Activité enzymatique (UI/ml)	Ecart type
S1	7	0.166	0.179
S2	7	0.131	0.205
S3	7	0.154	0.235
S4	7	0.078	0.116
S5	7	0.133	0.197
S6	7	0.133	0.197
S7	7	0.088	0.130
S8	7	0.077	0.116
S9	7	0.082	0.122
S10	7	0.155	0.234

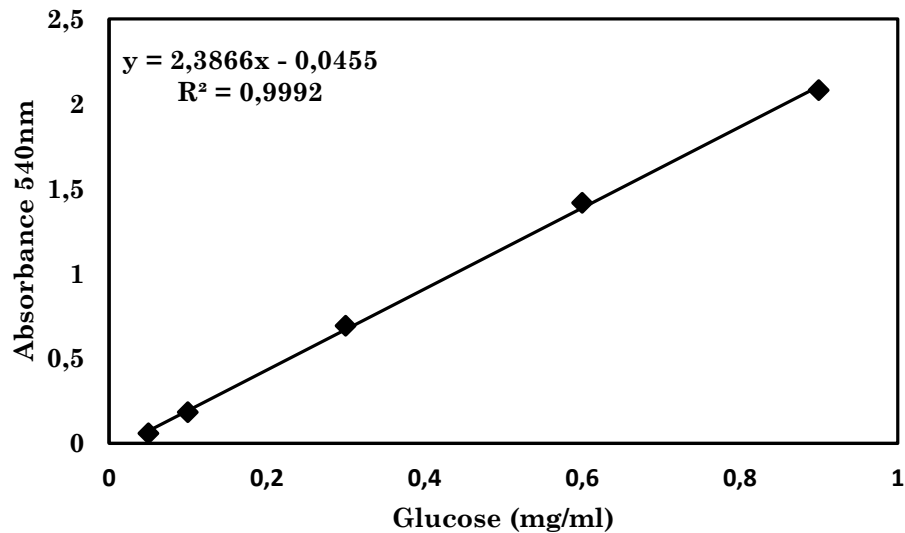


Figure 6 . Courbe d'étalonnage réalisée avec du glucose.

3.4. Identification des souches

3.4. 1.Observations macroscopiques

Les colonies produites sont généralement rondes d'un diamètre d'environ 1 à 2 mm, Entières et bombées dans le boite de pétri de couleur crème et visqueuse à 40 °C.

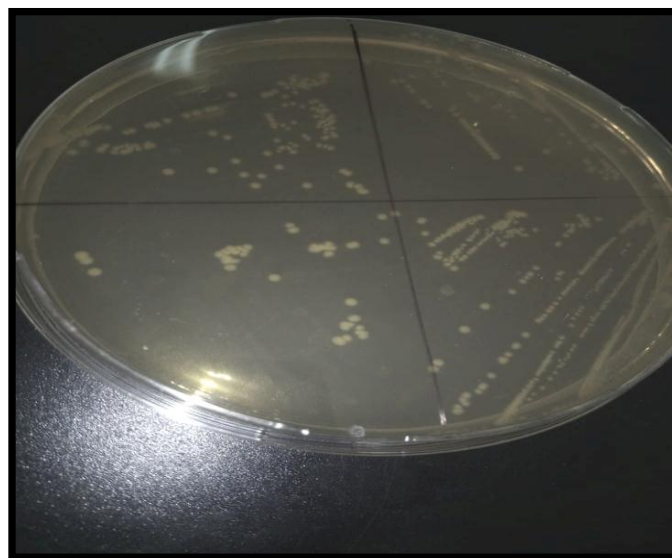


Figure 7: Aspects macroscopiques des colonies sur le milieu solide CMC après 8 jours d'incubation..

3.4.2.Observation microscopique

La mobilité de la souche S1 dans la même direction indique que c'est une souche immobile. Ce résultat est confirmé par le test de mannitol (DENIS et *al.*, 2011) .

3. 4.3. La coloration de Gram

Après la réalisation de la coloration de Gram, l'observation nous a permis de déterminer le type, la forme et l'arrangement des cellules. La forme des cellules est de type cocci à Gram positive régulier avec arrangement isolé.

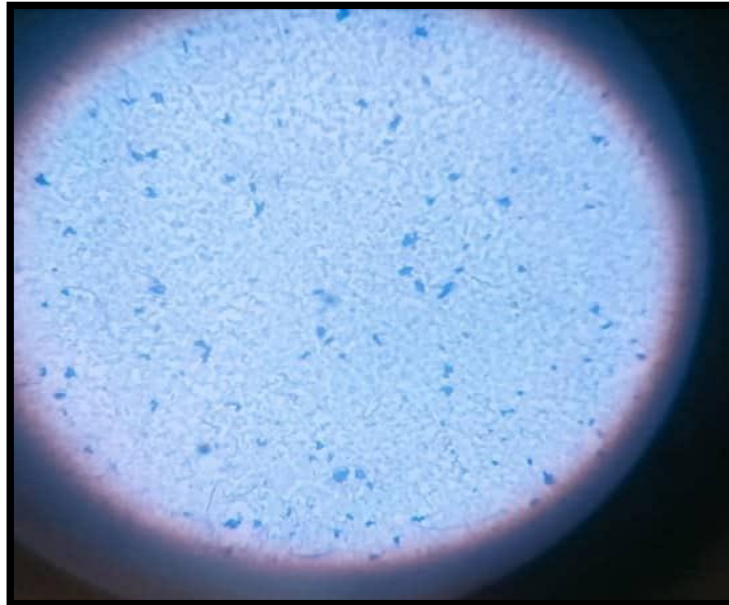


Figure 8. Observation microscopique de la souche S1 après la coloration de Gram à Gx100.

3.4.5. La coloration des spores

Après réalisation de la coloration des spores, l'observation montrée que la souche S1 est non sporulée.

3.5. Tests biochimiques

3.5.1. Test de catalase

L'apparition de bulles d'air indique que la souche S1 est capable de produire l'enzyme respiratoire qui permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau oxygénée H_2O_2 .



Figure 9. Test de catalase (résultat positive).

3.5.2. Test d'oxydase

La bactérie possède l'oxydase car elle est capable d'oxyder la forme réduite du dérivé N-méthyles du paraphénylènediamine en semi-quinone (rose violacé).

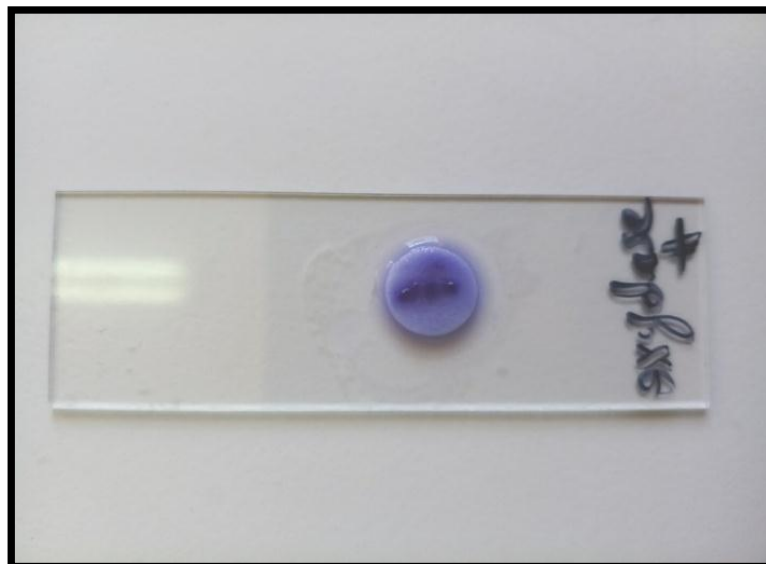


Figure 10. Test de l'oxydase (oxydase positive).

3.5. 3.Réduction des nitrates

Après ajout des réactif NR1 et NR2 au milieu nitrate, il y a une apparition d'une couleur rouge indique une réduction des nitrates en nitrites donc la bactérie possède une nitrate réductase positive.

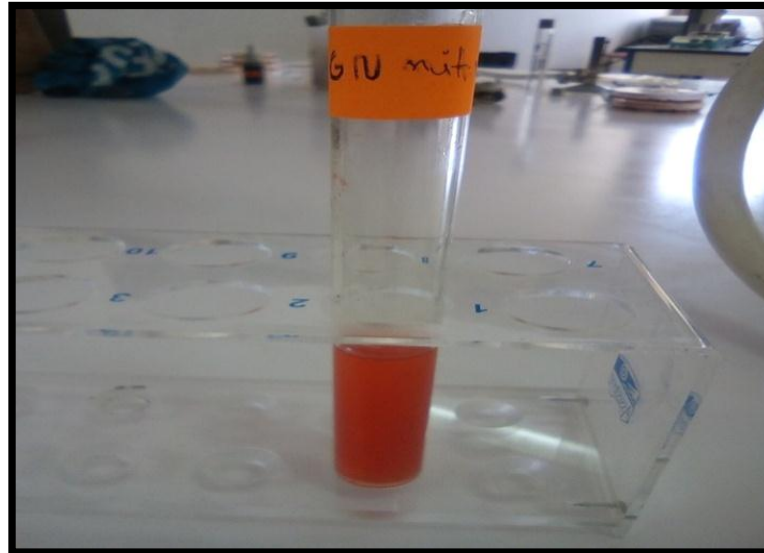


Figure 11. Test de la nitrate réductase après l'ajout de NR1 et NR2 (résultat positive)

3.5.4 Uréase

Après incubation du milieu urée-Indole, il y a une variation de la couleur du milieu aux rose indique un test positif.



Figure 12. Test uréase (résultat positive).

3.6. Tests physiologiques

3.6 .1.Type respiratoire

D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué que le teste est positive il y'une croissance tout au long de la pique centrale qui s'est propagée tout le long du tube. Donc, la

souche S1 est aéro-anaérobie facultative, elle peut se développer en absence ou en présence d'oxygène.



Figure13. Test du type respiratoire (bactérie aéro anaérobie facultatif).

3.7.Voies fermentaires

3.7.1. Réaction de Voges-Proskauer

D'après les résultats obtenus et en présence d'une base forte (soude ou potasse) et d'a-naphtol, l'acétoïne donne une coloration rouge (teste positive).



Figure14. Résultat de Voges-Proskauer (résultat positive).

3.7.2 Réaction au rouge de méthyle

La virage de la couleur jaune vers le rouge du milieu Clark et Lubs par le rouge de méthylène indique que la souche fermente le glucose en acides mixtes.

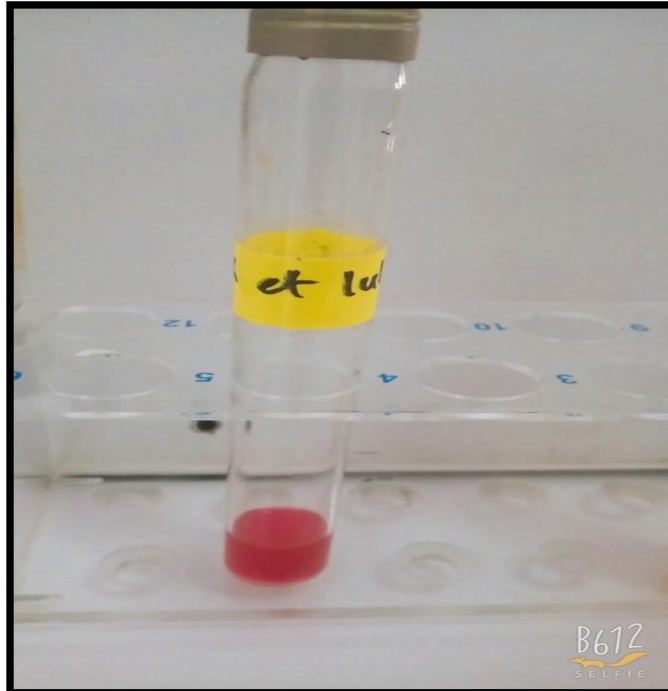


Figure15. Test de rouge de méthyle (résultat positive).

3.7.3. Production d'indole

Après l'incubation pendant 24h et l'ajoute de cinq gouttes du réactif de Kovacs, on observe que il n'ya pas la formation d'un anneau rouge. Sa signifié que la souche ne dégrade pas le tryptophane en indol et donc elle est possède indol négative.



Figure16. Test de rouge de méthyle (résultat positive).

3.7.4 Le milieu TSI (Triple Sugar Iron)

Après l'incubation pendant 48h, on observe qu'il ya un changement de couleur vers l'orange et aussi la production d'un gaz, ce qui signifie que la souche fermente le glucose, lactose et le saccharose.



Figure 17. Test TSI (Résultat positive).

3.7.5. Production de sulfure d'hydrogène

L'absence d'un précipité noir dans le tube indique que la souche S1 donc notre souche n'a pas réduit le thiosulfate de sodium en H₂S et on dit souche H₂S - .



Figure18. Test de production de H₂S (résultat négative).

3.7.6.Utilisation du citrate de Simmons

La souche S1 est incapable de croître sur le milieu citrate de Simmons, cela indique qu'elle n'utilise pas l'acide citrique comme source de carbone et d'énergie due à l'absence de l'enzyme citrate perméase.



Figure19. Test d'utilisation du Citrate (résultat négative).

3.7.7.Fermentation du glucose

La présence de jaunissement dans tout le milieu indique que la souche S1 fermente le glucose .



Figure20. Test de fermentation du glucose (positive).

3.7.8.Oxydation des glucides

L'absence de jaunissement dans tout le milieu indique que la souche S1 n'oxydés pas le glucose.



Figure21. Test d'oxydation du glucose (négative).

3.8.Températures de croissance

Après l'incubation dans différentes températures la souche S1, on observe que elle est fait leur croissance entre 30°-40°C, donc cette elle est mésophile.

3.9. pH de croissance

après 21 jours d'incubation à 30° C, on observe il ya un trouble microbien dans les tubes de pH=7 ,pH= 8.

3.10.Croissance à différentes concentrations de NaCl

Après 14 jours d'incubation, on observe que il ya un trouble microbien dans tous les tubes.

La souche S1 est un coccus à Gram positif ne formant pas des spores, immobile catalase et oxydase positive. En se basent sur ces caractères biochimiques et physiologiques on peut rapprocher la souche S1 au genre *Micrococcus* notamment de l'espèce *Micrococcus luteus*. (Stackebrandt.,*et al.*,1995).

La souche S1 semble avoir des caractéristiques similaires de l'espèce *Micrococcus luteus* (Tableau III)

Tableau III: Comparaison entre les caractères biochimiques et microbiologiques de la souche S1 et l'espèce *Micrococcus luteus* (Akayli, 2016).

Caractéristiques	Souche S1	<i>Micrococcus luteus</i>
Morphologie	coques	coques
Gram	+	+
Présence d'endospores	-	-
Production d'indole	-	-
Oxydase	+	+
Catalase	+	+

Type respiratoire	A. Ana. Fac	A
Réaction de V-P	+	+
Mannitol mobilité	-	v
H ₂ S	-	-
Utilisation du citrate	-	-
Fermentation Glucose	+	+
Oxydation des glucides	-	+
T° de croissance	30°-40°C	25-37°C

(+) positive, (-) négative, (A. Ana. Fac) aérobie anaérobie facultatif, (A) aérobie, (V) variable.

Classification de *Micrococcus*.

Famille : Micrococcaceae.

L'ordre : Actinomycetales.

Genres : *Micrococcus*.

l'espèce : *Micrococcus luteus*.

Des espèces de ce genre tel *Micrococcus roseus* sont connues par leur production de cellulases. Dans les conditions utilisées dans notre travail, 40°C et pH 7, la souche *Micrococcus luteus* donnait une activité enzymatique de 0.166 UI/mL ,après 48h d'incubation sur la CMC. Une autres espèce de *Micrococcus* à monté une activité plus proche dans ces mêmes conditions. En effet, dans une étude d'optimisation, la production et le rendement d'une cellulase par *Micrococcus roseus* (AR) a été évaluée aux températures 27°C et 37 °C, à

pH6-9 et aux périodes d'incubation 24h, 48h et 72h, en utilisant différentes concentrations de CMC. La souche produit plus de cellulase à 37 °C qu'à 27 °C avec 1% de la CMC après 48h d'incubation. Elle montrait une activité de 0,68295 UI/mL à pH 7, et une activité plus faible à pH élevé et bas.

Conclusion

Ce travail concerne l'isolement d'une souche microbienne productrice de cellulases à partir d'excrément d'un dromadaire de la région d'Elhajeb, Biskra.

Plusieurs souches ont été isolées à 40°C et pH 7 sur milieu solide à base de CMC, ce qui indique la richesse des excréments de dromadaire en microorganismes lignocellulolytiques. Elle constitue ainsi une nouvelle source intéressante pour la recherche de ces microorganismes.

Parmi ces nombreuses souches, 10 souches ont été sélectionnée sur la base de la formation de zone claire autour de leur colonie. La formation de ces zones est révélateur d'une activité cellulases extracellulaire. Les enzymes extracellulaires sont plus faciles à purifier réduisant ainsi le coût de leur production.

La deuxième sélection réalisée par mesure de l'activité cellulase dans le surnageant des cultures liquides, a permis de sélectionner une souche S1 avec la plus grande activité.

La caractérisation phénotypique de la souche S1 montre qu'elle appartiendrait au genre *Micrococcus*. Les membres de ce genre sont connus par leur production abondante de cellulases et comme importants agents, confirmée dans ce travail, dans le recyclage du carbone contenu dans les matières lignocellulosiques. La souche montre des similarités avec l'espèce : *Micrococcus luteus*.

Ce travail est une esquisse pour l'étude des souches cellulotiques d'excrément d'un dromadaire de la région d'hajeb, biskra, et il ouvre le champ à plusieurs perspectives:

- ✓ L'optimisation des paramètres physiologiques optimaux de la culture et de production des cellulases par cette souche.
- ✓ Confirmer l'identification de cette souche par des tests chimiotaxonomiques, une identification moléculaire et des analyses phylogénétiques.
- ✓ Extraire et purifier les molécules bioactives produites (enzymes).
- ✓ Etude des propriétés physico-chimique et la cinétique de ces enzymes.

Référence bibliographique

1. Acharya S., Chaudhary A. 2011. Effect of nutritional and environmental factors on cellulases activity by thermophilic bacteria isolated from hot spring. *Journal of Scientific & Industrial Research* (70) :142-148.
2. Akayli, T., Albayrak, G., Ürkü, C., Çanak, Ö., & Yörük, E. 2016. Characterization of *Micrococcus luteus* and *Bacillus marisflavi* recovered from common dentex (*Dentex dentex*) larviculture system. *Mediterranean Marine Science*, 17(1), 163-169.
3. Bagnara C. 1986. Identification et caractérisation d'une nouvelle bactérie cellulolytique mésophile : *Cellulomonas fermentans*. Etudes physiologiques et biochimiques. Thèse de Doctorat ès Sciences. Université d'Aix-Marseille. France, 196p.
4. Baird-Parker, AC 1965. *Micrococcus* et leur classification. *Annales de l'Académie des sciences de New York*, 128 (1) : 4-25.
5. Bajaj B.K., Shama M., Rao R.S. 2014. Agricultural residues for production cellulase from *Sporotrichum thermophile* LAR5 and its application for saccharification of rice straw. *J. Mater. Environ. Sci* 5 (5):1454-1460.
6. Capitant J. F. 1968. La Carboxyméthyl cellulose de Sodium. *Port. Quinn* 10 (91): 91-98.
7. cellulose substrates by the cellulase system from *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol.* 43 (5): 1125-1132.
8. Claus D. and Berkeley R. C. W., 1989. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174, p. 1105-1139.
9. Clementi, A. 1922. La désamidation enzymatique de l'asparagine chez les différentes espèces animales et la signification physiologique de sa présence dans l'organisme. *Archives Internationales de Physiologie* 19(4) : 369-398.
10. Combo, A. M. M., Mario, A., & Paquot, M. 2011. Les oligosaccharides pectiques: production et applications possibles. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 15(1), 153-164.
11. Dashtban M., Maki M., Leung k.T., Mao C., Qin W. 2010. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical reviews in biotechnol* ; 1-8.
12. Denis F., Poly M .C., Martin C., Bingen E., Quentin R. 2007. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Elsevier Masson, Paris, France. pp257.
13. Eloutassi, N., Louaste, B., Boudine, L., & Remmal, A. (2014). Valorisation de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol de deuxième génération. *Revue des Energies Renouvelables* 17(4) : 600-609.

14. Fonty G. et Durand C. F. 2007. Les écosystèmes digestifs. 1^{er} Edition, Technique & Documentation, Paris. 79-94.
15. Jeolovich M. 2008. Cellulose as a nanostructured polymer. *Bioresources*. 3: 1403-1418.
16. Johnson E A., Sakajon M., Halliwell G., Demain A L. 1982. Saccharification of complex
In Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E. and Holt J. G. (ed), *Bergey's manual of systemtic bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
17. Karmakar M. and Ray R. R. 2011. Current trends in research and application of microbial cellulases. *Microbiology* 6:41-53.
18. Lakhundi S., Siddiqui R., Khan N.A. 2015. Cellulose degradation: a therapeutic strategy in the improved treatment of *Acanthamoeba* infections. *Parasit vectors*. 8 :2-3.
19. lamed R., Setter E., Kenig R., Bayer E A. 1983. The cellulosome a discrete cell surface organelle of *Clostridium thermocellum* which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities. *Biotechnol Bioengin Symp*. 13: 163-181.
20. Malherbe S. and Cloete T. E. 2002. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. *Biotechnology* (1):105-114.
21. Mc Carthy A. J. (1987). Lignocellulose degrading actinomycetes. *FEMS Microbiol*. 46: 145-163.
22. Menendez E., Fraile P. G., Rivas R. 2015. Biotechnological application of bacterial cellulases (2):163-183.
23. Miller G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing .sugar. *Anal. Chem* (31): 426-428
24. Nisha, P., Das, A., & Saritha, K. V. (2014). Production of cellulase from *Micrococcus* sp and effect of growth parameters. *Int. J. Pharm. Res. Health Sci*, 2(3) : 236-240.
25. O'Donohue M. J. 2013. La Biomasse simple source d'énergie ou source de matières Premières renouvelables. *Innovations Agronomiques* (26):.41-50
26. Odier, E Agosin, E. 1985 Fermentation à l'état solide, dégradation de la lignine et digestibilité de la paille de blé fermentée par certains champignons responsables de la pourriture blanche. *Microbiologie appliquée et biotechnologie*, 21 (6) : 397-403.
27. Renaud F. N. R., 2000. Précis de bactériologie clinique. ESKA.
28. Res D., Vian B., Bajon C. 2006. Le monde des fibres. Edition, Belin, Paris, pp. 17-26.
29. Rivière J. 1975. Les applications industrielles de la microbiologie. p : 31-195.

30. Saha B. C., Bothast R. J .1997. Enzymes in Lignocellulosic Biomass Conversion .In: Fuels and chemicals from Biomass. Saha B. C., Woodward J. éd. American Chemical Society Doc, washington: 46-56.
31. Saidi A. 2011. La biomasse lignocellulosique et la bioénergie. BDivision Bio-énergie & Environnement 21 : 4-5.
32. Scriban R. 1993. Biotechnologie. 4^{ème} édition. Technique et Documentation – Lavoisier, Paris. P: 40.
33. Singleton P.2005. Bactériologie : pour la médecine, la biologie et les biotechnologies : cours Coll. Sciences sup, 6^é Ed. 542 p.
34. Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O. et Schumann, P. 1995. Dissection taxonomique du genre *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., et *Micrococcus* Cohn 1872 gen. corriger. *Revue internationale de microbiologie systématique et évolutive* , 45 (4) : 682-692.
35. Tabka M.G., Herpoël-Gimbert I., Monod F., Asther M. and Sigoillot J.C.. 2006. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme Microb. Tech.* 39 : 897-902
*Enzyme Microb.Tech.*39 : 897-902.
36. Tchunden J. 1990. Cellulolyse Anaérobie Mésophile : Etude de l'amélioration de la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum* ATCC 35 31 9. Thèse de Doctorat de l'Université Nancy I. France.
37. Thoorens G ., Krier F ., Leclercq B., Carlin B ., Evrard B. 2014. Microcrystalline cellulose, a Direct compression binder in a quality by design environment—A review .*International Journal of Pharmaceutics* (473) : 64–72
38. Voget S., Steele H.L., Streit W.R. 2006. Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. *Journal Biotechnology* 126: 26-36.
39. Wong K. K. Y., Tan L. U. L., Saddler J. N. 1988. Multiplicity of B-1, 4-xylanases in microorganisms: functions and applications. *Microbial Rev* 52: 306-317.
40. Zhang G., Li S., Xue Y., Mao L., Ma Y. 2012.Effects of salts on activity of halophilic cellulose with glucomannanase activity isolated from alkaliphilic and halophilic *Bacillus* sp. BG-CS1016: 35-43.

Annexes

Annexe I :

La composition de DNS

L'eau distillé.....	800ml
NaOH.....	16g
DNS.....	10g
Tartrat.....	300g

La composition de tampon (pH 7)

Solution NaH_2PO_4 (0.2M)	39ml
Solution Na_2HPO_4 (0.2M).....	61ml
L'eau distillé	150ml

La compositions du substrat

Avicel/CMC.....	1g
Tampon.....	100ml

Annexe 02

Tableau: Activité cellulase sur milieu CMC liquide à 40°C, à pH 7.

suche	T1	AE	T2	AE	T3	AE
S1	0.195	0.3060	0.72	0.133	0.354	0.006
S2	0.199	0.368	0.124	0.022	0.218	0.004
S3	0.23	0.425	0.173	0.037	0.248	0.004
S4	0.115	0.212	0.113	0.037	0.098	0.001
S5	0.195	0.360	0.202	0.020	0.164	0.003
S6	0.195	0.242	0.111	0.020	0.164	0.003
S7	0.131	0.242	0.101	0.020	0.119	0.002
S8	0.114	0.210	0.116	0.018	0.125	0.002
S9	0.121	0.223	0.13	0.021	0.114	0.002
S10	0.23	0.425	0.214	0.039	0.148	0.002

ملخص

في وسط غذائي صلب كربو كسي مثيل السليلوز (CMC) ، تم عزل العديد من سلالات *mésophile* متوسطة الحجم من عينة براز الجمل (*Camelus dromedarius*) من منطقة Ehadjeb ، بسكرة. في خطوة أولي تم اختيار مناطق صافية حول المستعمرات ، تم عزل 10 سلالات على الوسط الصلب القائم على CMC. في خطوة ثانية ، بناءً على قياس نشاط CMCCase في طاف الثقافات السائلة ، أظهرت إحدى السلالات أعلى نشاط للسليلوز (0.166 وحدة دولية / مل) عند 40 درجة مئوية ودرجة الحموضة 7. سلالة ينتمي إلى جنس *Micrococcus* والأنواع *Micrococcus luteus*.

الكلمات المفتاحية: البراز ، *Camelus dromedarius* ، بكتيريا *mésophile* ، CMCCase ، *Micrococcus luteus*.

Résumé

Dans un milieu solide à base carboxyméthyle cellulose (CMC), plusieurs souches ellulolytiques mésophiles ont été isolées à partir d'un échantillon d'excrément d'un dromadaire (*Camelus dromedarius*) de la région d'Ehadjeb, Biskra. Dans une première étape de sélection sur la base de la formation de zones claires autours des colonies, 10 souches ont été isolées sur le milieu solide à base de CMC. Dans une deuxième étape, basée sur la mesure de l'activité CMCCase dans les surnageant des cultures liquides, l'une des souches a montré l'activité cellulase la plus élevée (0.37475 UI/ml) à 40° C et pH 7. La souche appartiendrait au genre *Micrococcus* et à l'espèce *Micrococcus luteus*.

Mots clés : excréments, *Camelus dromedarius*, bactérie mésophile, CMCCase, *Micrococcus luteus*.

Abstract

In a carboxymethyl cellulose (CMC) solid medium, several mesophilic ellulolytic strains were isolated from a camel excrement sample (*Camelus dromedarius*) from the Ehadjeb area, Biskra. In a first selection step based on the formation of clear zones around the colonies, 10 strains were isolated on the CMC-based solid medium. In a second step, based on the measurement of CMCCase activity in the supernatants of liquid cultures, one of the strains showed the highest cellulase activity (0.37475 IU / ml) at 40 ° C and pH 7. The strain belongs to the genus *Micrococcus* and the species *Micrococcus luteus*.

Key words: excrement, *Camelus dromedarius*, mesophilic bacterium, CMCCase, *Micrococcus luteus*.

