



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biologie Appliquée

قسم : البيولوجيا التطبيقية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Microbiologie et Hygiène hospitalière

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Mise en évidence de la production d'enzyme laccase par différentes
souches de *Bacillus***

Présenté par : CHERTIOUI Soundous

Le : 12/06/2024

DELLAL Souheila

Jury d'évaluation :

Président : Mme HARZALLAH Basma (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : Mme YUCEF-ALI Mounia (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Examineur : Mme CHENTLI Amira (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Année universitaire
2023 - 2024

Remerciements

En préambule à ce mémoire, nous remercions Allah qui nous a réconciliés et nous a permis d'accomplir ce travail.

Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères et chaleureux à Mme YOUCEF-ALI M. pour son soutien et son accompagnement tout au long de notre travail.

Nous remercions Mme. HARZALLAH B. pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury.

Et nos vifs remerciements s'adressent à Mme. CHENTLI A. pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail en acceptant de l'examiner.

Enfin, nous tenons à exprimer nos gratitude à l'ensemble de l'équipe du laboratoire N° 14 ,Faculté de science de la nature et de la vie, ainsi qu'à tous ceux qui ont contribué, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Du profond de mon cœur , je dédie ce travail à tous qui me sont chers

À mes cher parents

Chertioui Ahmed lakhder , Chougui Ourida

Aucune dédicace ne serait exprimer mon respect . Mon amour éternel et ma
considération

pour les sacrifiés que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être .
Je vous remercie pour tous le soutien et l'amour que vous me porter depuis mon
enfance et

j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours .

Papa , mama , reposer votre cœur .votre rêve est devenue ,enfin votre petite fille
est devenue

diplômée comme tu as tant imaginée et désirée .

A mes merveilleux frères et sœurs

Chacun de vous sourires a illuminé mon chemin

Chaque mots d'encouragement a Nour mes rêves

Merci d'avoir à mes anges gardiens cette réussite et aussi la votre

À mes petites anges

Aria et chahine

A mon âme amie Wissem Mebarki

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection
et mes pensées, vous êtes pour moi ma sœur sur qui je peux compter.

En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments
que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une
vie pleine de santé et de bonheur.

Soundous ...

Dédicace

Je remercie tout d'abord mon Dieu de m'avoir accordé le courage, la patience et la conscience nécessaires pour rédiger ce modeste travail
que je le dédie

À mes très chers Papa et Maman, qu'il ont toujours été là pour
moi, m'apportant leur soutien inconditionnel et leur
encouragements constants

À mes chères sœurs Khadidja , Mayar , Asma , Loudjaine et
Razzan

À mon cher fiancé, Abderrahman, Que cette dédicace soit le
reflet de ma gratitude et de mon amour infinis envers toi

À mes amis Merci pour vos conseils et soutien de tous les
jours...

Et à toute ma famille

Souheila...

Liste des abréviations

LMBG	Lignin Medium Basal Gaïacol
GN	Gélose Nutritive
RC	Rouge Congo
BM	Bleu de Méthylène
BB	Bleu de Bromothymol
VM	Vert de Malachite
RMP	Rotation par minute
UI	Unité enzymatique International
SAB	Sabouraud
MH	Muller Hinton
LB	Luria Bertani

Liste des figures

Figure 1 : L'évolution du nombre d'espèces de <i>Bacillus</i> a travers les années	4
Figure 2 : Structure chimique d'une portion du site actif de la laccase montrant l'emplacement des atomes de cuivre impliqués dans la réaction enzymatique	12
Figure 3 : Fermentation sur milieu LB.....	22
Figure 4 : Mise en évidence de la laccase sur milieu LMBG par les bactéries S0B et S14 par la méthode des stries serrées.....	26
Figure 5 : Mise en évidence de la laccase sur milieu LMBG par les bactéries S0B et S14 et 2 par la méthode	26
Figure 6 : Mise en évidence de la laccase sur milieu LMBG par les bactéries S0B et S14 et 2 par la méthode de touche d'ose. des disques	26
Figure 7 : Aspect microscopique des bactéries sous microscope optique avec un grossissement X100. (Coloration de gram)	28
Figure 8 : Résultats après traitement thermique des bactéries	29
Figure 9 : Résultat du test catalase des bactéries S14 ,S0B et 2.....	29
Figure 10 : Résultat du test d'oxydase des bactéries S14 ,S0B et 2	30
Figure 11: Résultat du test de nitrate réductase des bactéries S14 , SoB et 2.....	30
Figure 12 : Détermination de type respiratoire des bactéries S14 , S0B et 2.....	31
Figure 13: Détermination de la voie d'attaque des glucides des bactéries SoB et S14, et 2.....	31
Figure 14 : Dégradation du citrate de Simmons des bactéries S14,S0B et 2.....	32
Figure 15 : Résultat du test mannitol mobilité des bactéries S14, S0B et 2.....	33

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification du genre <i>Bacillus</i>	4
Tableau 2: Classification morphologique du genre <i>Bacillus</i>	5
Tableau 3: Origine et aspect des bactéries après réactivation.....	25
Tableau 4: Résultat des tests de l'activité anti microbienne, et détermination de diamètre des zones d'inhibition.....	27
Tableau 5: Caractères macroscopiques des bactéries S0B, S14 et 2.....	28
Tableau 6: Utilisation de citrate de Simmons par les bactéries S14, S0B et 2.....	32
Tableau 7: Résultat de dégradation des colorants synthétiques par la bactérie S0B.....	35
Tableau 8: Résultat de dégradation des colorants synthétiques par la bactérie S14.....	35
Tableau 9: Résultat de dégradation des colorants synthétiques par la bactérie 2.....	36
Tableau 10: Résultat du test de l'activité anti microbienne par les surnageants de culture et détermination de diamètre des zones d'inhibition.....	37

Table des matières

1.Introduction	1
2.Revue bibliographique	
2-1Généralité sur <i>Bacillus sp.</i>	3
2-1-1 Taxonomie.....	4
2-1-2 Habitat	5
2-1-3 Morphologie.....	6
2-1-4 Caractère culturaux.....	7
2-1-5 Caractère biochimique.....	7
2-1-6 Caractère métabolique	8
2-2 Les enzymes produits par <i>Bacillus</i>	8
2-2-1 Les protéases.....	8
2-2-2 Les amylases.....	8
2-2-3 Les lipases	9
2-2-4 Les cellulases	9
2-2-5 Les laccases	9
2-3 Les laccases	10
2-3-1 Définition	10
2-3-2 Les origines des laccases	10
- Chez les plantes.....	10
- Chez les insectes	11
- Chez les mycètes	11
- Chez les bactéries	11
2-4 Structure de laccase	12
2-5La production de laccase	12
2-6 Les facteurs qui influence l'activité laccasique	13
2-6-1 Spécificité du substrat	13
2-6-2 Influence du température.....	13
2-6-3 Influence du Ph	14
2-7 Les applications du laccase.....	14
2-7-1 Industrie alimentaire.....	14
2-7-2 Industrie pharmaceutique	15

2-7-3 Industrie des textiles	15
2-7-4 Nano biotechnologie et biomédecine.....	16

3- Matériels et méthodes

3-1 Réactivation des bactéries.....	17
3-2 Etude de l'activité laccasique.....	17
3-3 Etude de l'activité biologique des bactéries	17
3-3-1 Test anti fongique.....	17
3-3-2 Test anti bactérien	18
3-4 Identification des bactéries S0B,S14 et2	18
3-4-1 Etude macroscopique	18
3-4-2 Etude microscopique	18
- Observation à l'état frais.....	18
- Coloration de Gram	19
3-4-3 Traitement thermique	19
3-4-4 Etude biochimique	19
-Test catalase	19
- Test doxydases.....	20
-Test nitrate réductase	20
-Détermination du type respiratoire	20
-Détermination de la voie d'attaques des glucides.....	21
- Détermination de dégradation de Simmons	21
- Test mannitol mobilité	22
3-5 Mise en fermentation	22
3-6 Dosage de l'activité laccasique	22
3-7 Application sur laccase	23
3-7-1 Dégradation des colorants synthétiques	23
3-7-2 Test anti microbiennes	23

4 .Résultats et discussions

4-1 Réactivation des bactéries.....	25
4-2 Etude de l'activité laccasique.....	25
4- 3 Etude de l'activité biologique des bacteries	27
4-4 Identification des bactéries	27
4-4-1 Etude macroscopique	27

4-4-2 Etude microscopique	28
4-4-3 Traitement thermique	29
4-4-4 Etude biochimique	29
-Test catalase	29
- Test d'oxydase	30
- Test nitrate réductase	30
- Détermination de type respiratoire	31
- Détermination de la voie d'attaque des glucides	31
- Dégradation du citrate de Simmons	32
- Test mannitol mobilité	32
4-5 Mise en fermentation	33
4-6 Dosage de l'activité laccasique	33
4-7 Application sur la laccase	34
4-7-1 Dégradation des colorants synthétiques	34
4-7-2 Activité anti microbiennes	36
5 . Conclusions et perspectives.....	38

Résumé

Abstract

ملخص

6. Références bibliographiques

7. Annexes



Introduction

Introduction

La laccase, une enzyme à base de cuivre découverte en 1883, appartient à la superfamille des multi cuivre oxydases (MCO) ; fait partie des premières enzymes identifiées. Après près de 140 ans de recherche, il est établi que cette protéine, dotée de propriétés catalytiques uniques, est largement répandue dans tous les règnes du vivant. Grâce à ses propriétés catalytiques uniques et sa capacité à convertir l'oxygène en eau sans sous-produits nocifs, la laccase a évolué pour remplir une fonction importante, commune et protectrice dans les systèmes vivants (Janusz *et al.*, 2020).

Les laccases ont été identifiées chez divers organismes, incluant des champignons, des bactéries, des plantes et des insectes. Les premières observations datent de Yoshida, (1883) chez *Rhusvernificifera*, et leur caractérisation comme oxydases métalliques a été réalisée par Bertrand, (1985). Ces enzymes, ont été également trouvées dans d'autres plantes et champignons. Les études sur les laccases bactériennes sont relativement plus récentes (Debnath *et al.*, 2020) .

La commercialisation des laccases fongiques est limitée par des facteurs tels que la longue fermentation, le faible rendement et la sensibilité aux conditions de réaction. Cependant, les laccases bactériennes connaissent une croissance rapide en raison de leurs caractéristiques industrielles, telles que leur stabilité et leur capacité à fonctionner dans une large gamme de températures et de pH. Elles offrent également des avantages supplémentaires, notamment une large spécificité de substrat, une production rapide et une facilité de clonage et d'expression (Chauhan *et al.*, 2017) .

La laccase a une large gamme d'applications dans divers processus chimiques et industries, notamment la bioremédiation, la nano-biotechnologie, l'industrie du bois, le blanchiment de la pâte à papier, la teinture textile, l'agroalimentaire, le bioraffinage, la détoxification des eaux usées, la production de composés organiques à partir de substrats phénoliques et aminés, ainsi que la production de biocarburants (Khatami *et al.*, 2022) .

Tout cela révèle, la nécessité de recherche de nouvelles laccases d'origine bactériennes pour profiter de leurs nombreuses propriétés et les utiliser dans ces divers domaines.

De ce fait, l'objectif de notre travail, repose sur la production d'enzyme laccase par différentes souches de *Bacillus*, utilisées comme agent de dégradation de colorants nocifs à la

santé humaine, et dans la lutte contre certaines espèces pathogènes pour l'Homme que ce soit fongiques ou bactériennes.

En effet le travail porte sur :

- 1- L'étude de la production de l'enzyme laccase sur milieu spécifique par trois différentes souches bactériennes (SoB, S14 et 2);
- 2- Etude morphologique et biochimique approfondie des bactéries SoB, S14 et 2 ;
- 3- Mise en fermentation sur milieu synthétique et dosage de l'activité laccasique des bactéries SoB, S14 et 2 ;
- 4- Mise en évidence de quelques applications biologiques de la laccase d'origine bactérienne.



Revue Bibliographique

2- Revue bibliographique

2-1- Généralité sur *Bacillus sp.*

Le genre *Bacillus* est un groupe de bactéries qui a une longue et riche histoire dans les annales de la microbiologie. Dans les années 1870, Ferdinand Cohn, chercheur à l'Université de Breslau (Pologne), a isolé une petite bactérie mobile et aérobie à partir d'une infusion de foin chauffée. Il l'a nommé *Bacillus subtilis* (bâton fin). Cohn a fourni la première description précise du cycle de vie de *Bacillus* (Farah *et al.*, 2020) .

La création de ce genre en 1872 par Ferdinand Cohn, qui changera le nom donné par Ehrenberg en 1835 en l'une des plus anciennes bactéries décrites, *Vibrio subtilis*, fut un événement marquant dans l'histoire de la microbiologie (Farah *et al.*, 2020) .

Le genre *Bacillus* regroupe des bactéries aérobies strictes ou aéroanaérobies facultatifs, sporogènes, se présentant sous forme de bâtonnets Gram positif généralement mobiles (Benchabi, 2021).

En dehors de *Bacillus anthracis*, les autres espèces de *Bacillus* sont souvent considérées comme des organismes environnementaux, avec leur impact sur la santé humaine souvent sous-estimé. Cependant, il est désormais établi que certaines espèces de *Bacillus* peuvent causer des toxi-infections alimentaires ou, plus rarement, des infections opportunistes chez l'homme. *Bacillus cereus* est le principal agent pathogène impliqué, mais d'autres espèces telles que *Bacillus licheniformis* ou *Bacillus subtilis* peuvent également jouer un rôle dans ces affections (Benchabi, 2021).

Les espèces du genre *Bacillus* ont été utilisées comme organismes modèles pour l'étude de la formation de biofilms depuis de nombreuses années, servant de microorganismes de travail majeurs dans la microbiologie appliquée et sont connues pour leur arsenal massif de métabolites secondaires (Xinming, 2023) .

La diversité métabolique remarquable des espèces du genre *Bacillus*, combinée à une faible incidence de pathogénicité documentée, a favorisé leur utilisation dans un large éventail d'applications industrielles. En effet, les souches de *Bacillus spp* sont fréquemment exploitées pour la production de biomolécules d'intérêt, telles que des antibiotiques, des produits de chimie fine, des insecticides et des enzymes (Farah *et al.*, 2020) .

2-1-1- Taxonomie

Le genre *Bacillus* appartient à la famille des *Bacillaceae*, qui est classée dans l'ordre des *Bacillales*, la classe des *Bacilli*, et le phylum des *Firmicutes*. Ce genre est connu pour être l'un des plus grands genres de bactéries, avec plus de 200 espèces. Cependant, depuis la création du genre *Bacillus*, le nombre d'espèces a varié, avec de nombreuses espèces initialement décrites comme *Bacillus* ayant été transférées vers d'autres genres apparentés (Ghorzi *et al.*, 2018).

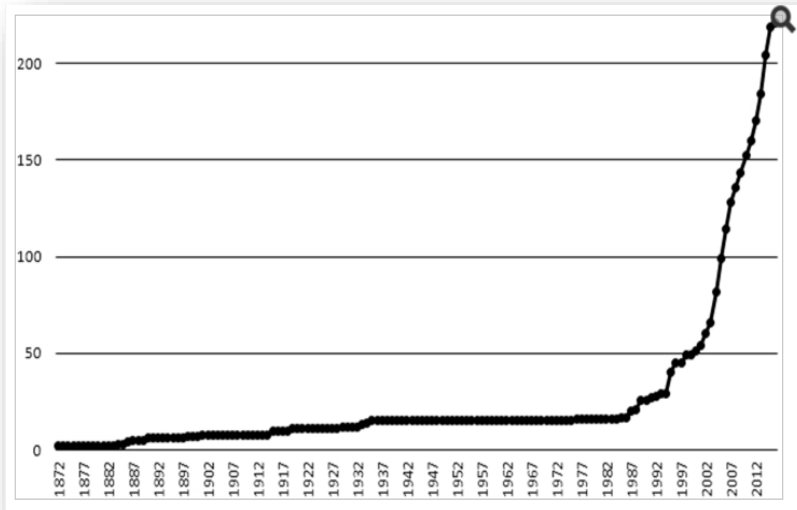


Figure 1 l'évolution du nombre d'espèces de *Bacillus* à travers les années (Ghorzi *et al.*, 2018).

- Classification du genre *Bacillus* selon Bergeys Manual of systematic bacteriology est :

Tableau 1 classification du genre *Bacillus* selon Bergeys Manual of systematic bacteriology (Paul *et al.*, 2009).

Domaine	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Bacillaceae</i>
Genre	<i>Bacillus</i>

Le genre *Bacillus* est caractérisé par une hétérogénéité, manifestée par la variété étendue d'environnements écologiques qu'occupent ses nombreuses espèces, ainsi que par la grande diversité de leurs classifications taxonomiques (Ghorzi *et al.*,2018) .

La classification des espèces du genre *Bacillus* a évolué au fil du temps. Initialement, les espèces étaient classées en fonction de leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques, ainsi que leur capacité à sporuler. Aujourd'hui, la classification des espèces du genre *Bacillus* repose sur l'analyse comparative des séquences de base de l'ARNr 16S par séquençage d'oligonucléotides (Hadj Kadour et Benaziza, 2020) .

Anciennement, le genre *Bacillus* était classé en trois principaux groupes en fonction de la morphologie de la spore et du sporange, comme illustré dans le tableau 2.

Tableau 2 classification morphologique du genre *Bacillus* (Ghorzi *et al.*,2018) .

Groupes		Espèces	Caractéristique
Groupe 01	Sous-groupe A	<i>B.anthraxis</i> , <i>B.cereus</i> , <i>B.mycooides</i> , <i>B.megaterium</i> , <i>et</i> <i>B.thuringiensis</i> .	Bactéries à grandes cellules avec une largeur supérieure ou égale à 1µm. Bacilles à coloration de Gram positif. Production des spores ellipsoïdes ou cylindriques. Spores centrales ou terminales, qui ne dilatent pas les sporanges.
	Sous-groupe B	<i>B.subtilis</i> , <i>B.pumilis</i> , <i>B.licheniformis</i> , <i>B.coagulans</i> , <i>et</i> <i>B.firmus</i> .	Bactéries à petites cellules (diamètre inférieur à 1µm)

Groupe 02	<i>B.alvei</i> , <i>B.brevis</i> , <i>B.circulans</i> , <i>B.larvae</i> , <i>B.lentimorbus</i> , <i>B.macerans</i> , <i>B.polymyxa</i> , <i>B.popillae</i> et <i>B.stearothermophilus</i> .	Elles sont à coloration de Gram variable, et ont des sporanges gonflés avec des spores ellipsoïdes centrales ou terminales
Groupe 03	<i>B.sphaericus</i> , <i>B.globisporus</i> et <i>B.insolitus</i> .	Elles sont des espèces hétérogènes à coloration de Gram variable. Les sporanges sont gonflés, avec des spores sphériques terminales ou subterminales.

2-1-2- Habitat

La majorité des espèces de *Bacillus* sont saprophytes et largement répandues dans la nature. Leurs principaux habitats incluent les sols, les colonnes d'eau, ainsi que les sédiments d'eau douce ou salée (Farhat *et al.*,2008) .

Elle peut être trouvée dans des habitats variés, la poussière et l'air ; De plus on peut également les rencontrer dans les animaux, la litière, les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, y compris les produits laitiers, les viandes et les aliments pour bébés (Elguess et Slimani, 2022) .

Les *Bacillus* constituent une importante fraction de la communauté microbienne, cohabitant avec des commensaux appartenant principalement aux genres *Pseudomonas* et *Actinomyces*. Ils sont présents dans tous les horizons et possèdent une diversité de capacités physiologiques leur permettant de vivre dans une grande variété d'habitats, tels que l'eau de mer, les profondeurs de la mer, les sédiments, les marais, les sources d'eau,, les fourrages, les composts, les volailles, ainsi que dans de nombreux habitats extrêmes tels que les sables du désert, les sources chaudes et les sols de l'Arctique (Farah *et al.*,2020) .

2-1-3- Caractères morphologique :

Les bactéries du genre *Bacillus* se présentent sous la forme de bâtonnets avec des extrémités carrées ou arrondies, variant en taille de 0,5 à 1,2 µm de diamètre et de 2,5 à 10 µm de longueur. Elles peuvent être droites ou légèrement incurvées et se trouvent isolées, en paires, en chaînes de longueur variable, voire en longs filaments ; généralement mobile grâce à une ciliature péritriche. Ces bactéries ont la capacité de former des endospores, une par cellule, qui est extrêmement résistantes à diverses conditions défavorables (Ghorzi *et al.*,2018) .

Les bactéries du genre *Bacillus* peuvent être réparties en trois groupes en fonction de la forme de leurs spores, et la position de spores :

- Groupe I : Ce groupe rassemble les bacilles dont les spores ont une forme ovale ou cylindrique, sans déformation du corps bactérien (*B. cereus*, *B. lentus* et *B. megaterium.*) ; et dont la position des spores qui est centrale ou terminale.
- Groupe II : Ce groupe comprend les bacilles dont les spores centrale ou terminale, ont une forme ovale qui modifie la silhouette du corps bactérien (*B. circulans*).
- Groupe III : Ce groupe réunit les bacilles dont les spores rondes déforment le corps bacillaire (*B. sphaericus*) ; dont la position de spores et terminale ou sub-terminale (Medan, 2017) .

Les colonies de *Bacillus* présentent une morphologie très variable, tant au sein d'une espèce qu'entre les espèces, et sont fortement influencées par la composition du milieu de culture et d'autres conditions d'incubation. Cependant, malgré cette diversité, les colonies de *Bacillus* sur des milieux de culture ne sont généralement pas difficiles à identifier (Ghorzi *et al.*,2018) .

2-1-4- Caractères cultureux

Les bactéries du genre *Bacillus* sont généralement aérobies ou anaérobies facultatifs elles se développent mieux entre 28°C et 37°C leur croissance est optimale après 24 à 48 heures d'incubation.

Tous les *Bacillus* se développent sur les milieux de culture usuels comme gélose nutritive, gélose trypticase soja, gélose au sang. Cependant certaines espèces ont des exigences nutritionnelles plus spécifiques comme un besoin en azote ammoniacal.

- En gélose les colonies de *Bacillus* peuvent présenter une diversité des caractéristiques morphologiques selon les espèces, incluant des variations en taille, couleur et opacité.

- En bouillon ce germe se développe en formant un trouble floconneux qui se dépose au fond du tube (Benchabi, 2021).

2-1-5- Caractères biochimique

Les *Bacilles* présentent une diversité métabolique significative, ce qui rend leur identification complexe et repose principalement sur des caractéristiques biochimiques telles que la positivité à la catalase et aux oxydases, ainsi que la réduction variable des nitrates en fonction de l'espèce. Ils peuvent manifester une croissance aérobie ou anaérobie facultative et démontrent la capacité de fermenter divers sucres tels que le glucose et le saccharose. De plus, plusieurs espèces de bacilles ont la capacité de synthétiser des enzymes telles que des amylases, des lipases et des protéases (Benchabi, 2021).

2-1-6- Caractères métaboliques

Bacillus sont des microorganismes aux capacités physiologiques remarquables capables de dégrader une grande variété de composés organiques (cellulose, amidon, protéines, hydrocarbures, etc.) grâce à la production d'enzymes extracellulaires.

Ils sont également capables de produire des antibiotiques peptidiques ainsi que des molécules peptidiques de signalisation. Ces bactéries possédant une diversité métabolique (hétérotrophes, nitrifiantes, dénitrifiantes, fixatrices d'azote, capables d'oxyder le sélénium et le manganèse sous différentes formes). Elles peuvent survivre et se développer dans une grande variété de conditions environnementales : pH acides ou alcalins, températures basses ou élevées, fortes concentrations en sel (Farah *et al.*, 2020) .

2-2- Les enzymes produits par *Bacillus*

2-2-1- Les amylases

Les α -amylases, en particulier, suscitent un intérêt croissant en raison de leur large champ d'application dans diverses industries telles que l'alimentaire, textile, détergents, pharmaceutique, bio-alcools, etc. Ces enzymes sont présentes dans les règnes animal, végétal et microbien, mais celles issues de sources microbiennes dominent l'industrie en raison de leur production abondante et de leurs propriétés physicochimiques attrayantes.

Parmi les genres bactériens, le genre *Bacillus*, en particulier les espèces *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus amyloliquefaciens*, est

largement utilisé comme source industrielle pour la production d' α -amylases en raison de leur capacité à produire des enzymes thermostables de haute qualité (Bahnes et komichi, 2021) .

2-2-2- Les protéases

Les protéases sont également appelés peptidases, sont des enzymes qui capable d'hydrolyser les protéines, en scindant la liaison peptidiques qui lie deux acides aminées dans une chaîne peptidiques .Les protéases sont classées en deux catégories en fonction de leur site d'action : les protéases intracellulaire et protéases extracellulaire (Constesini *et al.*,2017) .

Les protéases jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus et produits industriels, représentant une part significative des ventes mondiales d'enzymes. Le genre *Bacillus* est largement reconnu comme une source majeure de protéases bactériennes, capable de produire des quantités élevées d'enzymes protéolytiques neutres et alcalines aux propriétés exceptionnelles. Ces enzymes se distinguent par leur stabilité face à des conditions extrêmes de température, de pH, de solvants organiques, de détergents et de composés oxydants (Constesini *et al.*,2017) .

La production de protéases chez l'espèce *Bacillus* débute pendant la phase stationnaire de croissance et est fortement influencée par les conditions de culture. La synthèse des protéases est liée au processus de sporulation, où la protéolyse réalisée fournit les acides aminés essentiels à la synthèse des protéines impliquées dans la formation des spores (Gahlouz , 2021) .

2-2-3- Les lipases

Les lipases appartiennent à la sous-classe des hydrolases spécifiques des esters carboxyliques ; ce sont des enzymes qui catalysent la décomposition des lipides en acides gras et en glycérol. Les lipases peuvent être produites à partir de micro-organismes par le biais du processus de fermentation. Elles peuvent également être extraites de plantes et d'animaux. Cependant, les lipases d'origine microbienne sont généralement plus stables que celles provenant de sources végétales ou animales. Diverses bactéries sont utilisées à l'échelle commerciale pour la production de lipases, notamment des espèces appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Chromobacterium*, *Alcaligenes*, *Achromobacter* et *Bacillus*. Parmi ces genres, le genre *Bacillus* est considéré comme le plus utile pour l'industrie. Ces bactéries capables de produire une grande variété d'enzymes et sont reconnues comme de puissants producteurs de lipases extracellulaires (Mazhar *et al.*,2017)

2-2-4- Les cellulase

Une grande diversité de genres bactériens sont connus pour leur capacité à dégrader la cellulose, notamment (*Cytophaga*, *Streptomyces*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora* et *Ruminococcus*, *Bacillus*) ; Ces microorganismes cellulolytiques sont largement répandus dans l'environnement (Ben Harzaallah, 2021) .

La cellulase dérivée de la souche *Bacillus* a été largement examinée pour son utilisation dans les détergents à lessive. Les bactéries sont souvent préférées aux champignons pour la production industrielle de cellulases en raison de leur capacité de croissance rapide. De plus, les manipulations génétiques des bactéries sont plus aisées que celles des champignons (Elguess et Slimani, 2022).

2-2-5- Les laccases

La laccase bactérienne a été découverte pour la première fois chez *Azospirillum lipoferum*. Elle est impliquée dans la pigmentation cellulaire, l'oxydation de composés phénoliques et/ou le transport d'électrons. Elle a été identifiée également dans d'autres bactéries telles que *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Aquifex aeolicus*, *Bacillus halodurans*, *Alpha protéobactérie*, *Pseudomonas maltophila*, *Streptomyces antibioticus*, *Thermus thermophilus* et *Xanthomonas*, etc (Chibi et Zerkin, 2019) .

La laccase bactérienne la plus célèbre actuellement est la CotA de *Bacillus subtilis*, qui fait partie de la structure des endospores. La protéine CotA, similaire aux oxydases multi-cuivre, possède quatre sites de liaison au cuivre, caractéristiques des laccases fongiques (Lu *et al.*, 2012) .

2-3- Les laccases

2-3-1- Définition

Les laccases également connue sous le nom de benzène diol : oxygène oxydoréductase (EC1.10.3.2), une enzyme de type ligninases, possède la capacité de décomposer la lignine. Cette enzyme oxydative à base de cuivre interagit spécifiquement avec divers résidus phénoliques de la lignine en présence d'oxygène en tant qu'accepteur d'électrons. Sa spécificité de substrat et son utilisation de l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons, contrairement à la peroxydase lignolytique qui utilise le peroxyde d'hydrogène,

en font un outil très prometteur pour des applications tant industrielles et environnementales (Lanteigne Roch, 2010).

2-3-2- Origines de laccases

- Chez les plantes supérieures

Contrairement aux champignons, la présence de laccases dans les plantes supérieures semble moins importante. Cependant, les laccases végétales ont été étudiées et caractérisées, notamment la laccase de *Rhus vernicifera*, qui est la mieux connue. L'arbre de laque, qui appartient à la famille des *Anacardiaceae*, contient des laccases dans ses canaux de résine. De plus, des cultures de cellules *pseudoplatanus* Acer ont révélé la présence de huit laccases, principalement exprimées dans le xylème de *Pinus taeda*. Les laccases ont également été identifiées dans les graines et les embryons de maïs (*Zea mays*). En outre, ces enzymes ont été trouvées dans divers autres végétaux tels que les choux, les navets, les betteraves, les pommes, les asperges, les pommes de terre et les poires (Bouaouina et Gharfi, 2015).

- Chez les mycètes

En 1896, Bertrand a été rapportée la laccase fongique pour la première fois et observée que cette enzyme était responsable du changement de la couleur des champignons du genre *Boletus* au contact de l'air. L'activité laccasique a été identifiée dans plus de 60 espèces fongiques appartenant à des genres tels que *Trametes*, *Agaricus*, *Polyporus*, *Botrytis*, *Neurospora* et *Aspergillus*. De plus, les laccases ont été purifiées à partir de dizaines d'espèces fongiques différentes. La plupart des laccases fongiques sont des enzymes extracellulaires. Cependant, les *basidiomycètes* sont les principaux producteurs de laccases, qu'elles soient intra- ou extracellulaires. Cette classe de champignons joue un rôle actif dans la biodégradation de la lignine, grâce à la production de laccases. De nombreux champignons *mycorhiziens* excrètent également des laccases dans leur environnement (Sedrati et Harrag, 2016)

- Chez les insectes

La laccase d'insecte est une longue séquence amino-terminale caractérisée par un domaine unique composé de plusieurs résidus conservés de cystéine, d'aromatiques et de charges. L'enzyme laccase a été identifiée et étudiée chez divers insectes tels que *Bombyx*, *Calliphora*, *Diploptères*, *Drosophila*, *Lucilia*, *Manduca*, *Musca*, *Orycètes*, *Papilio*, *Phormia*, *Rhodnius*,

Sarcophaga, *Schistocerca* et *Tenebrio*. Récemment, deux isoformes du gène de la laccase 2 ont été trouvées pour catalyser le tannage de la cuticule des larves, des nymphes et des adultes chez *Tribolium castaneum* (Chibi et Zerkin, 2019).

-Chez les bactéries

La laccase bactérienne a été signalée pour la première fois chez *Azospirillum lipoferum* ; elle joue un rôle dans la pigmentation cellulaire, l'oxydation des composés phénoliques et/ou le transport d'électrons. D'autres bactéries connues pour produire de la comme (*E. coli* ; *Bacillus subtilis* ; *Streptomyces laven dulae* ; *Streptomyces cyaneus* ; *Marinomonas mediterranea* ; *Aquifex aceolicus* ; *Azospirillum lipoferum* ; *Bacillus sp.* ; *Bacillus halodurans* ; *Leptothrix discophora SSI* ; *Oceanobacillus iheyensis (cotA)* ; *Alphaproteobacterium SD21* ; *Gammaproteobacterium JB* ; *Pseudomonas fluorescens GB-1* ; *Pseudomonas maltophila* ; *Pseudomonas putida GB1 (cumA)* ; *Pseudomonas syringae pv tomato (copA)* ; *Pseudomonas aerophilum (pae1888)* ; *Streptomyces antibioticus* ; *Streptomyces griseus (epoA)* ; *Thermus thermophilus HB27* ; *Xanthomonas campesteris (copA)* ; *Streptomyces psammoticus MTCC 7334*) (Chibi et Zerkin, 2019).

2-4-Structure de laccase

Les laccases, en tant que métalloenzymes, possèdent des atomes de cuivre dans leurs sites actifs respectifs, leur permettant d'oxyder des composés phénoliques et de réduire l'oxygène de manière simultanée.

En règle générale, les laccases se présentent sous forme de glycoprotéines dimériques ou tétramériques qui renferment quatre atomes de cuivre distincts au sein de leurs sites actifs. Ces atomes de cuivre, aux ligands variés, sont répartis sur trois sites désignés T1, T2 et T3. Les sites T1 et T2, chacun doté d'un atome de cuivre, jouent un rôle crucial dans le transfert d'électrons. Le site T1, caractérisé par un atome de cuivre (Cu⁺), absorbe à 610 nm et est associé à une cystéine, conférant à l'enzyme sa teinte bleue. En revanche, le site T2 contient du cuivre non bleu (Cu²⁺) et forme un complexe tétraédrique avec des histidines et de l'oxygène. Le site T3, absorbant à 330 nm. Chaque ion cuivre liée à trois histidines (Bouaouine et Gharfi, 2015) .

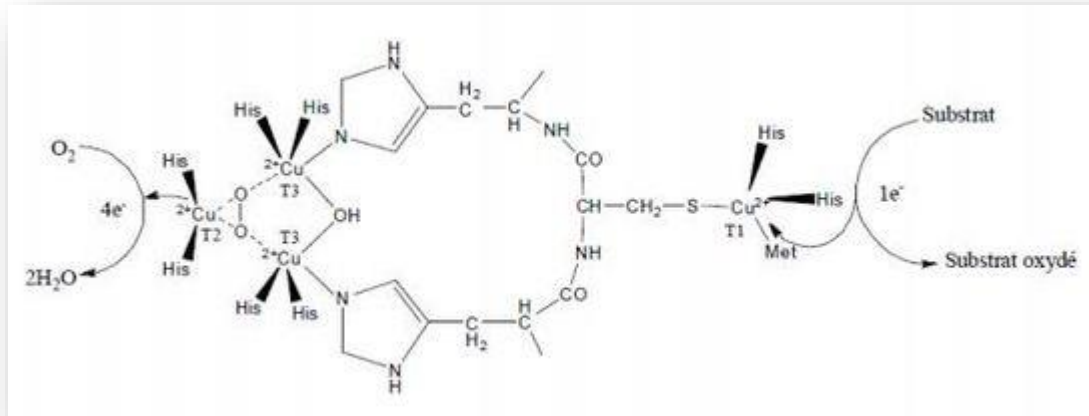


Figure 2 structures chimiques d'une portion du site actif de la laccase montrant l'emplacement des atomes de cuivre impliqués dans la réaction enzymatique (Rochefort, 2001).

2-5-La production de laccase

Les laccases ont été initialement identifiées dans l'arbre *Rhus vernicifera* en 1883 par *Yoshida*, et depuis lors, elles ont été découvertes et étudiées dans divers organismes tels que les plantes, les insectes, les champignons, les bactéries et les archées, trouvant des applications variées. Cependant, la plupart des laccases purifiées ont été obtenues en quantités limitées, restreignant ainsi leur utilisation à grande échelle. Le faible rendement constitue un défi majeur pour leur utilisation en enzymologie, ce qui a conduit à la mise en place de nombreuses stratégies visant à accroître la production de laccases de manière plus rentable (Kumar et Sharma, 2019).

L'utilisation de déchets industriels et agricoles pour la production de laccase par la pourriture blanche représente une méthode efficace pour abaisser les coûts de production. Divers substrats sont employés comme sources de carbone pour la production de laccases. Par exemple, *Savitha et al.*(2011) ont utilisé le son de blé et le son de riz comme substrats (*Bouaouine et Gharfi*, 2015).

Parmi les approches clés pour surmonter cette limitation figurent le screening de souches naturellement hyper-sécrétoires et l'utilisation d'organismes recombinants exprimant les laccases de façon hétérologue ou homologue dans des systèmes microbiens. De plus, pour améliorer la stabilité de l'enzyme diverses stratégies efficaces sont examinées pour augmenter la production de laccases, incluant le screening de nouvelles laccases prometteuses et la

production de laccases recombinantes, en mettant en lumière les systèmes recombinants (fongiques et bactériens) (Kumar et Sharma, 2019).

2-6-Les facteurs influencent l'activité laccasique

La production de laccase est influencée par divers facteurs, tels que la composition du milieu, la présence de nutriments comme le fer, le cuivre et le manganèse, des facteurs comme le pH, la température, le taux d'aération, la présence d'azote, de glucose, le temps d'incubations ...

2-6-1-Spécificité de substrats

Les laccases sont des enzymes polyvalentes capables d'oxyder une vaste gamme de substrats. Leurs actions varient selon la nature du composé. Lorsque le substrat est un polymère de lignine à faible masse moléculaire, les laccases favorisent la polymérisation ; En revanche, si le degré de polymérisation est élevé, un phénomène inverse se produit, entraînant une dépolymérisation. Les laccases peuvent transformer des composés tels que l'ABTS et la syringaldazine. Pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques comme l'anthracène et le benzopyrène, la transformation laccasique nécessite l'utilisation de médiateurs tels que l'ABTS, la méthionine, la cystéine, le glutathion réduit, l'aniline et l'acide 4-hydroxybenzoïque (Bouaouine et Gharfi, 2015).

2-6-2-Influence de température

La sensibilité de la production de laccase à la température est relativement modérée, avec des températures optimales variant considérablement d'une souche à l'autre. Des études ont révélé que la température idéale pour la production de laccase sous lumière est de 25°C, tandis qu'en l'absence de lumière, cette température optimale passe à 30°C (Shraddaha *et al.*, 2011) .

Les laccases typiques présentent généralement une température optimale d'activité comprise entre 50 et 70°C. En générale, les laccases démontrent une stabilité importante à des températures inférieures à 50°C, mais leur activité décline progressivement au-delà de 60°C. Cependant, certaines laccases possèdent une thermo-stabilité remarquable à des températures supérieures à 60°C, comme celles issues de *Trametes versicolor*, *Melanocarpus albomyces* et *Myceliophthora thermophila* (Mtibaa, 2019).

2-6-3-Influence du pH

La valeur optimale du pH pour les laccases dépend de la nature du substrat utilisé, car chaque substrat induit une réaction distincte et optimale à un pH spécifique (Shraddaha *et al.*,2011). La plupart des études suggèrent que le pH optimal se situe dans une fourchette comprise entre 4 et 4,5. Les champignons filamenteux de pourriture blanche, qui sont les principaux producteurs de laccases, présentent généralement une croissance optimale dans des conditions de pH acide. À titre d'exemple, la laccase produite par *Trametes modesta* était pleinement active à pH 4,0 et très stable à pH 4,5. Cependant, sa demi-vie a considérablement diminué, passant à seulement 125 minutes, lorsque le pH était abaissé à 3,0 (Bouaouine et Gharfi, 2015) . La laccase provenant de *Trametes versicolor* a démontré une activité enzymatique significative sur une large plage de pH et de températures, avec une activité optimale observée à un pH de 3,0 et à une température de 50 °C. En revanche, la laccase extraite de *Stereum ostrea* a affiché son activité maximale à un pH de 6,0 et à une température de 40 °C (Shraddaha *et al.*,2011) .

Cependant, l'influence du pH engendre deux effets opposés ; À des pH élevés, la diminution du potentiel redox des substrats phénoliques favorise leur oxydation par la laccase, tandis que la présence de groupements hydroxyles à ces pH élevés entrave l'activité enzymatique en perturbant le transfert d'électrons au niveau du site actif. Bien que la variation du pH ait un impact direct sur le taux d'oxydation, des études supplémentaires ont révélé que, pour un même substrat, les produits de la réaction d'oxydation diffèrent en fonction du pH utilisé (Mtibaa, 2019).

2-7-Les applications de laccase

2-7-1-Industrie alimentaires

De nombreux substrats de l'enzyme laccase, tels que les glucides, les acides gras insaturés, les phénols et les protéines contenant un thiol, sont couramment présents dans divers aliments et boissons. Lorsque ces substrats sont modifiés par l'enzyme laccase, cela peut entraîner la création de nouvelles propriétés, améliorer la qualité ou réduire les coûts (Bouaouine et Gharfi, 2015).

Dans l'industrie alimentaire, les laccases peuvent être utilisées dans divers processus visant à améliorer ou modifier la couleur et la qualité des aliments et des boissons. Une application particulièrement intéressante des laccases est l'élimination des composés phénoliques

indésirables, responsables du brunissement et de la turbidité dans les jus de fruits, la bière et le vin (Mtibaa, 2019). Les laccases sont également employées pour prolonger la durée de conservation de la bière.

Les laccases pourraient présenter un intérêt pour l'industrie des pâtes alimentaires. En effet, la laccase de *Trametes hirsuta* a la capacité d'améliorer la résistance d'une pâte à base de farine contenant du gluten tout en réduisant son extensibilité (Bouaouine et Gharfi, 2015).

2-7-2-Industrie pharmaceutique

Les laccases ont été employées dans la synthèse de divers produits de l'industrie pharmaceutique. Leur utilisation s'étend également à la préparation de médicaments essentiels, tels que les traitements anticancéreux, et à leur incorporation dans certains produits cosmétiques pour diminuer leur toxicité (Bouaouine et Gharfi, 2015).

Récemment, de nouvelles laccases issues de l'actinomycète *Thermobifida fusca* et du basidiomycète *Flammulina velutipes* ont été évaluées en tant qu'agents oxydants dans la formulation des colorants capillaires. Parallèlement, des formulations cosmétiques et dermatologiques contenant des laccases ont été développées pour éclaircir la peau. De plus, elles semblent jouer un rôle dans la formulation de certains produits d'hygiène tels que les désodorisants, en neutralisant les odeurs résultant de l'oxydation des groupes amines et thiols responsables (Mtibaa, 2019).

2-7-3-Industrie des textiles

Les colorants employés dans les processus industriels sont souvent caractérisés par une grande résistance à l'eau et à la lumière, ce qui rend difficile leur décoloration. Cependant, l'enzyme laccase offre une solution naturelle efficace pour résoudre ce problème. Elle est capable de décolorer même les colorants les plus résistants, ce qui en fait un outil prometteur pour être utilisé (Allal *et al.*, 2023) .

L'intérêt pour l'utilisation de la laccase dans l'industrie textile est en constante augmentation et se développe rapidement. En plus de décolorer les effluents textiles, la laccase est également employée pour le blanchiment des tissus textiles ainsi que pour la synthèse de teintures (Mtibaa, 2019).

2-7-4-Nano biotechnologie et biomédecine

Les laccases, en raison de leur capacité à catalyser des réactions de transfert d'électrons sans cofacteurs supplémentaires, ont été étudiées pour leur rôle dans le développement de biocarburants et biocapteurs. Ces biocapteurs utilisent l'oxygène consommé lors de l'oxydation de l'analyse par les laccases pour enregistrer les données. Les laccases *d'Aspergillus oryzae* et de *Myceliophthora thermophila* ont été utilisées pour détecter des composés phénoliques et l'oxygène. Ces biocapteurs ont été largement appliqués dans l'industrie alimentaire et la biomédecine pour détecter des polyphénols, l'insuline, la morphine et la codéine (Mtibaa, 2019).

A decorative graphic of a scroll with a blue outline and grey shading at the corners, framing the text.

Matériel et Méthodes

3- Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur, la mise en évidence de la production d'enzyme laccase par différentes souches bactériennes telluriques appartenant au genre *Bacillus*. Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire N° 14, Faculté SNV Université des Frères Mentouri Constantine 1.

3-1- Réactivation des bactéries

Les bactéries utilisées ont été fournies par le LaMyBAM, elles sont au nombre de trois et codés comme suit; SoB, S14 et 2. Ces dernières ont été réactivées par ensemencement en stries sur la Gélose Nutritive (GN) (annexe 1). Des repiquages consécutifs à 30°C ont permis de vérifier leur pureté.

3-2 Etude de l'activité laccasique des bactéries

Afin de mettre en évidence la présence d'une activité laccasique; les bactéries purifiées, ont été testées sur milieu LMBG additionnée de 0.02% du gaïacol (annexe 2) ce dernier, est un monométhoxybenzène dérivé du phénol avec un groupe méthoxy en position ortho (Chibi *et al.*, 2018), il a été utilisé comme substrat afin de détecter la présence de l'enzyme laccase responsable de l'oxydation du gaïacol. L'ensemencement a été réalisé par la méthode de stries sérés, la méthode des disques et par la méthode d'une touche d'ose d'une culture jeune au centre de la gélose. Les boîtes de Petri ont été incubées à 30°C pendant 15 jours. Des observations quotidiennes ont suivi l'émergence d'une zone brune rougeâtre, indiquant la présence d'une activité laccasique (Chibi et zerkin,2019).

3-3 Etude de l'activité biologique des bactéries

3-3-1 Test anti-fongique

Le test antifongique des bactéries SOB, S14 et 2 a été réalisé vis-à-vis de quelques souches fongiques pathogènes pour l'Homme en l'occurrence ; *Candida Albicans* et *Aspergillus sp.* . Ces dernières ont été fournies par le LaMyBAM. Le test consiste à rechercher l'activité biologique des bactéries sur le développement des souches fongiques, la méthode de diffusion sur gélose a été appliquée pour cet objectif. Un écouvillon stérile trempé dans les suspensions fongiques a servi à ensemencer uniformément toute la surface des boîtes contenant la gélose Saboraud (annexe 1). Après un séchage de la surface (environ 5min), un disque de 5mm de

chaque colonie bactérienne, réactivées préalablement sur GN, a été déposé sur la surface de la gélose étalée. Après un deuxième séchage, les préparations sont incubées à 37°C jusqu'au développement apparent des zones d'inhibition. Ces dernières sont mesurées au millimètre près (Errakhi et al., 2007).

3-3-2 Test anti-bactérien

Les souches bactériennes pathogènes utilisées dans le présent test ont été fournies par le laboratoire de bactériologie, CHU Constantine. Il s'agit de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. Pour ce faire, Un écouvillon stérile trempé dans les suspensions bactériennes a servi à ensemercer uniformément toute la surface de les boîtes contenant la gélose Muller Hinton (annexe 1). Après un séchage de la surface (environ 5min), des disques de 5mm de diamètre des bactéries SoB, S14 et 2 ont été déposés sur la surface de la gélose étalée. Après un deuxième séchage, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 à 48h. Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré au millimètre près (Errakhi et al., 2007).

3-4- Identification des bactéries SoB, S14 et 2

Rappelons que les bactéries utilisées dans le présent travail ont été isolées à partir du sol des régions semis arides situées au sud est Algérien. Afin de confirmer l'appartenance de ces bactéries au genre *Bacillus* différentes études ont été réalisées.

3-4-1- Etude macroscopique

Cette étude repose sur la détermination à l'œil nu de l'aspect de la colonie, de sa couleur et de son revers. Les colonies étudiées sont âgées de 24 heures et cultivées sur milieu GN (annexe 1) (Makonge, 2019) .

3-4-2- Etude microscopique

L'observation microscopique consiste à un examen de la taille, de la forme, de l'arrangement des cellules et l'évaluation de leur mobilité.

- Observation à l'état frais

L'observation microscopique à l'état frais permet d'examiner les bactéries vivantes et d'en déterminer la morphologie, le mode d'association et surtout la mobilité éventuelle. Cette

méthode implique de déposer une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile sur une lamelle, puis d'y ajouter et disperser un prélèvement bactérien de la colonie à observer. Ensuite, une lame creuse est placée sur la lamelle pour former une goutte suspendue. L'observation se fait à différents niveaux de grossissement (40X puis en immersion) (Makonge, 2019).

- Coloration de Gram

La coloration de Gram est la méthode de coloration différentielle la plus couramment utilisée en microbiologie. Elle permet de différencier les bactéries présentes dans un échantillon en fonction de leur forme (paires, groupes, chaînes...) et de leur réactivité aux colorants. Cette technique de coloration améliore la caractérisation des bactéries en les classant comme bactéries Gram positif ou Gram négatif, ainsi que comme bacilles ou coques en fonction de leur morphologie (Cissé et Moussa, 2023) . ; la réalisation de cette coloration faite par le prélèvement d'un frottis à partir d'une colonie bactérienne âgée de 24 heures. Ce frottis est ensuite fixé à la chaleur et recouvert de violet de Gentiane pendant 1 minute et rincée par l'eau. Ensuite, le colorant est éliminé par l'ajout de lugol pendant 1 minute. Le frottis est alors décoloré à l'éthanol pendant environ 20 secondes. Enfin, une contre-coloration à la Fuchsine est réalisée pendant 1 minute. L'observation du frottis coloré se fait d'abord au grossissement 40X, puis à l'objectif à immersion 100X (Makonge, 2019).

3-4-3 Traitement thermique

Ce test vise à confirmer la présence de structures sporales. Il implique la culture bactérienne dans des tubes contenant du bouillon nutritif, suivie d'une incubation à 30°C pendant 24 heures. Des dilutions sont ensuite préparées à partir des cultures précédentes dans de l'eau physiologique, puis chauffées à 80°C dans un bain-marie pendant 12 minutes. Un volume de 1 ml de chaque dilution est ensuite placé sur des boîtes de gélose nutritive pour l'ensemencement. La lecture des résultats se fait après une incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures (Youcef Ali, 2014) .

3-4-4- Etude biochimique

- Test catalase

Le test catalase est utilisé pour déterminer si la bactérie produit l'enzyme catalase, qui décompose le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. La bactérie est mise en contact

avec du peroxyde d'hydrogène; la présence de catalase se traduit par l'observation de la production de bulles d'oxygène (Gharsi et Sekefali, 2015) .

- Test oxydase

Le test de l'oxydase sert à détecter la présence de la cytochrome-oxydase, une enzyme qui oxyde le cytochrome c réduit. En utilisant des réactifs ayant un potentiel d'oxydo-réduction similaire à celui du cytochrome c. Ce test est mis en évidence par contact des colonies bactériennes pures et jeunes avec un disque d'oxydase stérile. La Coloration violette est traduite par une oxydase positive et l'absence de coloration indique une oxydase négative (Chouini et Tabouche, 2013) .

- Test de nitrate réductase

Ce test est mis en évidence par ensemencement d'une colonie bactérienne dans un bouillon nitraté et l'incuber à 30°C pendant 24h. Quelques gouttes de réactifs NR1 et NR2 de Griess ont été rajoutées pour évaluer la capacité des bactéries à réduire les nitrates en nitrites (Dhouib, 2017) . Les réactifs se combinent avec les nitrites présents dans l'échantillon pour former un composé coloré rouge azoïque soluble ; L'absence de coloration rouge après l'ajout des réactifs NR1 et NR2 peut avoir deux significations possibles :

- Les nitrates n'ont pas été réduits par les bactéries testées.
- Les nitrates ont été réduits au-delà du stade nitrites, par exemple en azote ou ammoniac.

Pour distinguer entre ces deux possibilités, on ajoute une trace de poudre de zinc au milieu de culture ;(a) si une coloration rouge apparaît après l'ajout de zinc, cela signifie que les nitrates étaient encore présents dans le milieu. La bactérie n'a donc pas réduit les nitrates (nitrate réductase négative); (b) si aucune coloration rouge n'apparaît après l'ajout de zinc, cela signifie que les nitrates avaient déjà été complètement réduits par la bactérie, au-delà du stade nitrites (nitrate réductase positive) (Makonge, 2019).

- Détermination de type respiratoire

Ce test permet de déterminer le type respiratoire d'une bactérie, c'est-à-dire définir son comportement vis-à-vis du dioxygène. Les bactéries peuvent être classées en fonction de leur exigence en dioxygène : aérobie strict (nécessitant de l'oxygène), anaérobie strict (ne pouvant survivre en présence d'oxygène) ou anaérobie facultatif (capable de vivre dans des conditions

avec ou sans oxygène). Pour ce faire, des tubes contenant un milieu de culture gélosé à base de viande et de foie sont stérilisés par chauffage au bain-marie bouillon pendant 30 minutes. L'inoculation de la souche bactérienne est effectuée à l'aide d'une pipette Pasteur en profondeur dans le tube, suivie d'une remontée pour assurer une répartition uniforme de l'inoculum sur toute la surface du milieu. Après solidification, les tubes sont incubés à 30°C pendant une période de 24 à 48 heures pour permettre la croissance bactérienne et l'observation des réponses respiratoires (Chibi et Zerkin, 2019) .

- Détermination de la voie d'attaque des glucides

La méthode consiste à utiliser un milieu MEVAG avec un indicateur de pH pour étudier l'assimilation de divers glucides et déterminer la voie métabolique des sucres (oxydation ou fermentation). Pour mettre en œuvre cette méthode, deux tubes sontensemencés, l'un étant couvert d'une couche d'huile de paraffine, en réalisant une piqure centrale avec un fil de platine chargé de semence prélevée d'une culture cultivée pendant 18 à 24 heures.

Après incubation, les bactéries sont classées en trois catégories : les bactéries fermentatives, qui provoquent une acidification rapide et uniforme des deux milieux, les rendant jaunes sur toute la hauteur de la piqure d'inoculation en 24 heures. Les bactéries oxydatives, montrent peu ou pas de croissance dans le tube fermé, sans acidification, mais peuvent provoquer un changement de couleur du milieu vers des teintes orangées en l'absence de culture visible. Enfin, les bactéries inactives présentent peu ou pas de croissance dans le tube fermé, tandis que dans le tube ouvert, il peut y avoir une croissance sans modification du pH ou une alcalinisation plus ou moins prononcée en surface (virage au rouge violet) (Makonge, 2019).

- Dégradation de citrate de Simmons

Le milieu citrate de Simmons permet d'étudier l'assimilation du citrate de sodium comme unique source de carbone. Seules les bactéries possédant l'enzyme citrate perméase sont en mesure de se développer sur ce milieu. Cette propriété métabolique permet donc de différencier les bactéries en fonction de leur capacité à utiliser le citrate comme substrat carboné (Mezani et Meziani, 2022). Pour mettre en œuvre cette méthode ; ensemencer le milieu par une strie centrale longitudinale sur la pente à l'aide d'une pipette Pasteur à partir d'une suspension bactérienne. Ensuite, le milieu est incubé pendant 24 à 48 heures à 30°C.

Citrate (+) : Le milieu de base vire au bleu en présence d'une souche capable d'utiliser le citrate comme seule source de carbone. Cela est indiqué par un changement de couleur dû à l'indicateur coloré et une alcalinisation du milieu.

Citrate (-) : Le milieu de base reste vert en l'absence de la capacité de la souche à utiliser le citrate comme seule source de carbone. Aucun changement de couleur n'est observé et aucune culture n'est présente dans le milieu (Mezani et Meziani,2022).

- Test mannitol-mobilité

Ce test permet de déterminer à la fois la mobilité de la bactérie et sa capacité à fermenter le mannitol. Le milieu utilisé est le milieu de mannitol mobilité en tubes à essai. L'ensemencement se fait par une piqure centrale. Les tubes de mannitol mobilité sont incubés à 30°C pendant 48 heures. Un changement de couleur du rouge au jaune indique la fermentation du mannitol ; Les bactéries mobiles se dispersent depuis le point d'ensemencement, créant un trouble dans le milieu, tandis que les bactéries immobiles poussent uniquement le long d'ensemencement (Belabbes et Akerma, 2019) .

3-5-Mise en fermentation

Après avoir vérifié la capacité des bactéries S14, S0B et 2 à produire l'enzyme laccase sur gélose, une fermentation a été lancée afin de calculer l'éventuelle activité laccasique des bactéries en question. Cette étape a été réalisée sur le milieu LB liquide (annexe1) et ce, dans des conditions optimales à savoir le pH et la température équivalents à 7 et 37°C respectivement. Pour ce faire, quelques colonies bactériennes jeunes des trois souches S0B, S14 et 2 ont servis à inoculer des erlenmeyer contenant 100 mL du milieu LB liquide. L'incubation est réalisée dans un incubateur agité (200 rpm) pendant 6 jours. Les cultures bactériennes obtenues sont centrifugées à 10000 rpm pendant 10 min à 4°C, les surnageants récupérés sont filtrés à l'aide de filtres stériles de 0.45µm de diamètre et conservés dans des tubes propres pour procéder au dosage enzymatique (Sing *et al.*, 2014) .

3-6- Dosage de l'activité laccasique

Le dosage de l'activité laccasique a été mis en évidence par la détermination spectrophotométrique dans le visible des produits de l'oxydation d'un substrat phénolique. Le gaïacol a été sélectionné comme substrat pour cette analyse. Les filtrats résultants de la filtration ont été utilisés comme extrait enzymatique lors de cette étape. L'activité des laccases

a été quantifiée en mélangeant 0,1 mL d'extrait enzymatique avec 4,9 mL de milieu réactionnel (annexe1), puis en incubant le mélange à 37°C pendant 45 minutes. Un blanc a été préparé en remplaçant l'échantillon par de l'eau distillée.

L'activité enzymatique est mesurée en unités internationales (UI), où 1 UI correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour oxyder 1 microlitre de gaïacol (Chibi et Zerkine,2019) . Les variations de l'absorbance ont été mesurées à 470 nm ; l'activité enzymatique a été calculée selon l'équation suivante :

Activité enzymatique = (Abs en 1 min) × V / (v × t × ε), avec :

V : volume total

v : volume de l'échantillon

t : temps d'incubation

ε du gaïacol : 0,674 μmol/L.

3-7- Application sur la laccase

3-7-1- Dégradation des colorants synthétiques

La capacité de la laccase microbienne à dégrader différents colorants, considérés comme nocif à la santé humaine, a été évaluée sur boîtes de Pétri qui contient un milieu LB (Annexe) supplémenté avec 0,25 g/L de l'un des quatre colorants testés : (RC), (VM), (BB) ou (BM) (voir Annexe) .Un témoins a été préparer pour permettre la comparaison des résultats. Les boîtes ont été inoculées avec la souche productrice de laccase, puis incubées à 30°C pendant 1 à 3 jours. Des observations quotidiennes ont été effectuées afin de suivre l'évolution de la dégradation des colorants utilisé (Chibi et Zerkine,2019) .

3-7-2- Activité anti-microbienne

L'activité antibactérienne et antifongique a été vérifiée cette fois ci, par les surnageants de culture obtenus après la fermentation (voir section 3-5 ci-dessus). Pour ce faire, la méthode de diffusion sur gélose a été appliquée (voir section activité biologique). Dans cette partie, le disque bactérien est remplacé par un volume de 80μl du surnageant de culture de chacune des trois bactéries. Le surnageant est déposé dans un puits qui a été créé au préalable en perforant

la gélose étalée par l'agent pathogène (fongique et bactérien). L'incubation est faite à 37°C jusqu'à apparition de zones d'inhibition (Errakhi *et al.*, 2007).

3-8- Conservation des souches


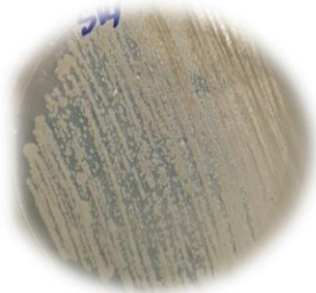

Les jeunes colonies bactériennes, sont aseptiquement transférées etensemencées dans des petits tubes contenant de la gélose nutritive et cela par pique centrale. Les tubes sont bien fermés et conservés au réfrigérateur à 4°C. En outre une autre méthode de conservation a été suivie, qui consistait à prélever les colonies de 24 H et les mettre dans des tubes à Ependorff contenant une solution de 20% e glycérol et les congeler à -20°C (Botton *et al.*, 1990).

4- Résultats et discussions

4-1- Réactivation des souches utilisées

Après une incubation de 24 heures, les bactéries S0B, S14 et 2 ont présenté une bonne croissance sur le milieu GN(annexe1). La pureté des souches a été confirmée en examinant les échantillons au microscope à divers niveaux de grossissement.

Tableau 3 origine et aspect des bactéries après réactivation.

Code bactérie	Origine	Aspect sur gélose (GN)
S0B	Sol de palmeraie	
S14	Sol de palmeraie	
2	Sol de sebkha	

4-2- Etude de l'activité laccasique des bactéries

L'activité laccasique des bactéries S0B, S14 et 2 a été démontrée sur un milieu LMBG contenant 0,02 % de gaïacol. Après 15 jours d'incubation à 30°C, une coloration brun rougeâtre a été observée au niveau des colonies bactériennes S0B, S14 et 2 (figure 4,5 et 6). Les résultats obtenus correspondent à ceux de Mabrouk *et al.* (2010) ; Chibi *et al.* (2018) qui ont montré que cette couleur indique l'oxydation du gaïacol par la laccase. Fatemeh Sheikh *et al.* (2012) ont pu isoler 16 bactéries appartenant au genre *Bacillus*. Ces bactéries sont productrices d'enzyme laccase dont une, identifiée comme étant *B. subtilis* JN082773, a présenté le taux de production le plus élevée.

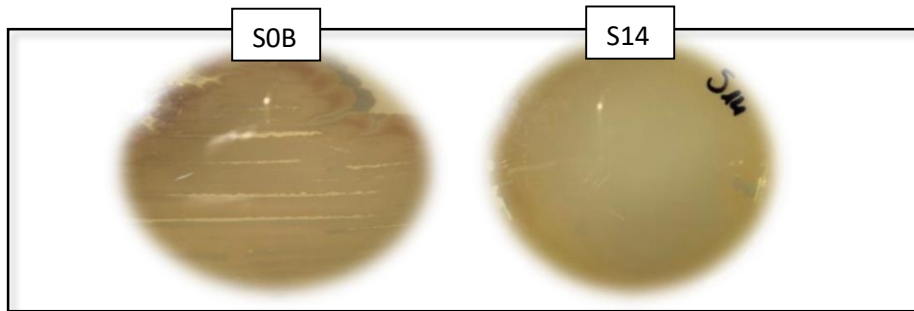


Figure 4 mise en évidence de la laccase sur milieu LMBG par les bactéries S0B et S14 par la méthode des stries serrés.

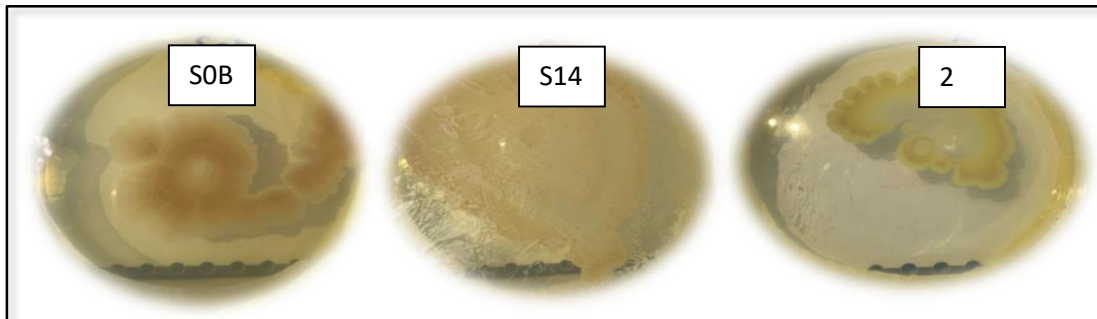


Figure 5 mise en évidence de la laccase sur milieu LMBG par les bactéries S0B et S14 et 2 par la méthode des disques.

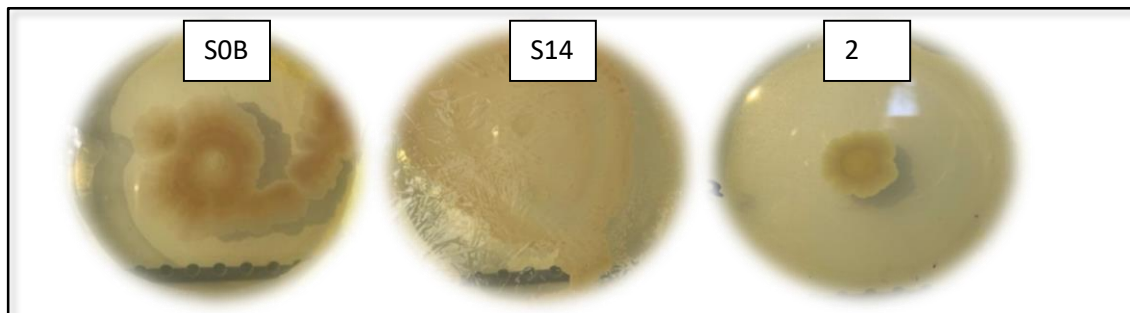


Figure 6 mise en évidence de la laccase sur milieu LMBG par les bactéries S0B et S14 et 2 par la méthode de touche d'ose.

4-3- Etude de l'activité biologique des bactéries

La mise en évidence de l'activité biologique des bactéries, vis-à-vis de quelques souches fongiques et bactériennes, connues comme pathogènes pour l'Homme, a montré la capacité inhibitrice du développement de certaines souches pathogènes à savoir; *C.albicans*, *Aspergillus sp.* et *Staphylococcus aureus* (tableau 4).

En effet, les bactéries sont connues par la production de substances antimicrobiennes puisque elles présentent un réservoir de molécules bioactives, englobant différentes enzymes de dégradation de la paroi fongique ainsi que différentes molécules antibiotiques (Liu *et al.*,2010). Des études effectuées par Ben Maachia *et al.* (2010) ont montré que des souches de *Bacillus* isolées à partir d'un sol salin sont dotées d'une activité, à la fois, antifongique et antibactérienne. De plus, l'étude effectuée par Balouiri *et al.*(2015) a révélé la capacité de *Bacillus* à inhiber la croissance de *C. albicans* par test de diffusion sur gélose.

Tableau 4 résultat des tests de l'activité anti-microbienne, et détermination de diamètre des zones d'inhibition.

Bacteries	Souches microbiennes				
	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SOB	+ (25mm)	+ (23mm)	+ (14mm)	- (00mm)	-
S14	+ (18mm)	+ (16mm)	+ (10mm)	-	-
2	+ (17mm)	+ (15mm)	+ (8mm)	-	-

+ présence de zone d'inhibition ; - absence de zone d'inhibition.

4-4- Identification des bactéries SoB , S14 et 2

4-4-1- Etude macroscopique

L'examen macroscopique des bactéries SoB, S14 et 2 sur milieu GN a révélé un développement rapide après 24h d'incubation. Les observations directes sur gélose, à l'œil nu sont résumé dans le tableau 4.

Tableau 5 caractères macroscopiques des bactéries S0B, S14 et 2

Critères Bactéries	Couleur	Forme	Surface	Consistance	Taille
S0B	Couleur crème	Grande colonie	Lisse	Crémeuse	Moyenne
S14	Blanche	Colonie moyenne	Lisse	Crémeuse	Moyenne
2	Jaune blanchâtre	Petite colonie	Lisse	Muqueuse	Petite

Ces observations sont conformes aux caractères généraux du genre *Bacillus sp.* décrites par Abe et al.(2018).

4-4-2- Etude microscopique

L'examen microscopique à l'état frais et la coloration de Gram ont fourni des idées sur la morphologie cellulaire, la mobilité et la composition de la paroi bactérienne. L'observation microscopique à l'état frais a révélé que les trois bactéries se présentent sous forme de bâtonnets mobiles. De plus, la coloration de Gram (figure 7) a montré que les bacilles apparaissent en violets, indiquant que la paroi cellulaire est imperméable à l'alcool en raison de sa composition en peptidoglycanes, ce qui nous a permis de conclure que les souches est Gram-positives. Ces résultats sont identiques à ceux rapportées par Madigan *et al.*(2007), décrivant les différents caractères microscopiques du genre *Bacillus*.

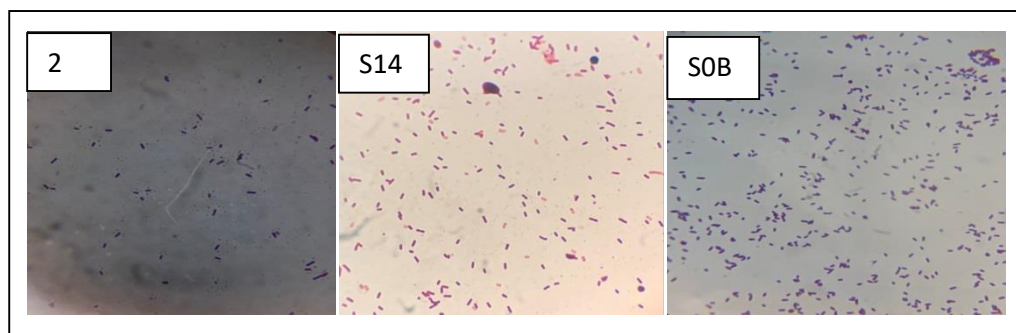


Figure 7 résultat de la coloration de Gram des bactéries S14, S0B et 2 sous microscope optique avec un grossissement X100.

4-4-3- Traitement thermique

L'ensemencement des suspensions bactériennes chauffées à 80°C, sur gélose nutritif a abouti à un développement de colonies bactériennes identiques à celles observées après réactivation des bactéries S14, S0B et 2 (figure 8) ce qui nous a permis de conclure qu'elles appartiennent effectivement au genre *Bacillus* caractérisé par la formation de spores (forme de résistance). Cette constatation est décrite par Cortezzo et Setlow (2005) ; qui ont reporté que les spores du genre *Bacillus*, peuvent être extrêmement résistantes à la chaleur, aux radiations et aux agents chimiques.

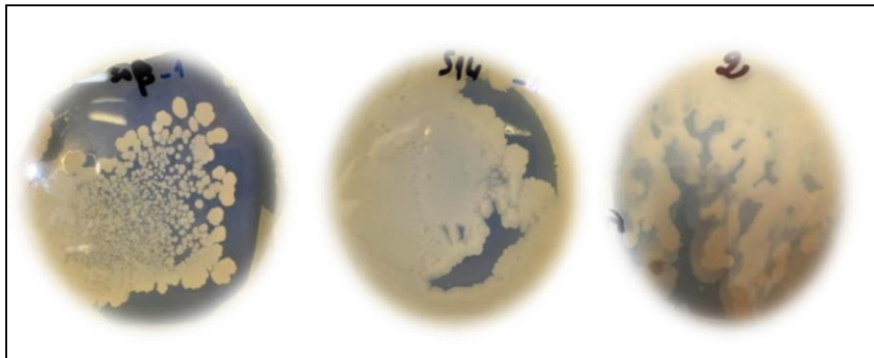


Figure 8 résultats d'ensemencement après traitement thermique des bactéries S0B, S14 et 2.

4-4-5- Etude biochimique

-Test catalase

Le test de catalase a révélé que les souches SoB, S14 et 2 sont catalase positives (figure 9). Une formation de bulles d'air après l'ajout de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ a été observée. Loewen *et al.*(1987) ont montré que les différentes espèces de *Bacillus* présentent une diversité significative dans les niveaux de catalase produites. Par exemple, *Bacillus coagulans* produit un niveau 1 000 fois plus élevé que *Bacillus laterosporus*. La catalase est présente à la fois dans les cellules végétatives et les spores de *B. subtilis*.

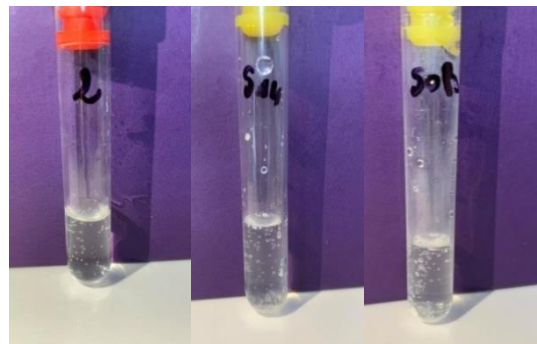


Figure 9 résultat du test catalase des souches S14, S0B et 2.

-Test oxydase

Le test a révélé que les souches SoB, S14 et 2 sont négatives pour l'oxydase, car le disque réactif d'oxydase n'a montré aucun changement de couleur au contact des colonies bactériennes (figure 10), indiquant ainsi un résultat négatif pour l'oxydase. Ce test détecte spécifiquement un type de chaîne respiratoire qui inclut un cytochrome C en bout de chaîne et une oxydase associée. La présence d'oxydase chez le genre *Bacillus* diffère d'une souche à l'autre (Aouadhi *et al.*,2014).

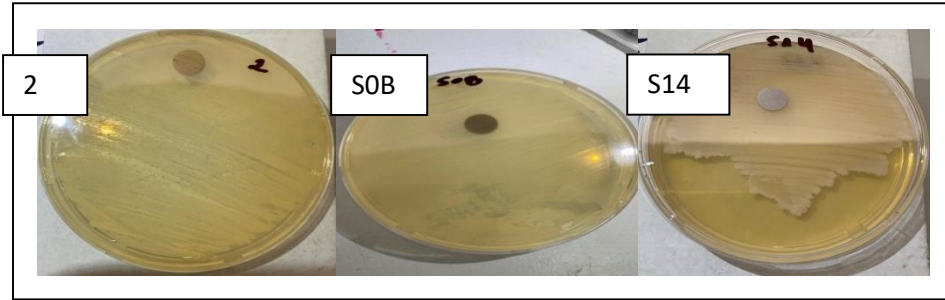


Figure 10 résultat du test d'oxydase des souches S14, SOB et 2.

- Test de nitrate réductase

Le test de la nitrate réductase a révélé que les deux souches SOB et S14 en question possèdent une nitrate réductase positive après le dépôt des réactifs 1 et 2 de Griess, une couleur rouge azoïque apparaît (figure 11); Cette réaction colorée indique la présence d'ions nitrite (NO₂⁻). Au contraire de la souche 2, qui a indiqué l'absence de coloration rouge après le dépôt des deux réactifs, même après l'ajout d'une trace de poudre de zinc (responsable de la réduction du nitrate en nitrite) aucun changement de couleur n'a été observé. Ces observations signifient qu'il y a deux NR et la réduction des nitrates a dépassé le stade nitrite (Makong,2019). Un regain d'intérêt pour le genre *Bacillus* a permis de mettre en évidence plusieurs caractéristiques notables, telles que la présence répandue de processus de réduction des nitrates et de dénitrification au sein de ce genre bactérien (Soleil *et al.*, 2016).

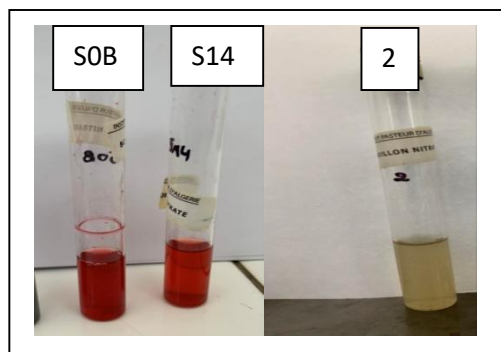


Figure 11 résultat du test de nitrate réductase des souches S14, SOB et 2.

- Détermination de type respiratoire

L'étude du type respiratoire des souches S0B, S14 et 2 cultivés sur un milieu viande-foie a révélé une croissance tout au long du tube (figure 12). Cela indique que ces souches bactériennes sont des bactéries aérobies-anaérobies facultatives. Ces résultats sont conforme avec les caractéristiques du genre *Bacillus* comme : *Bacillus cereus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus coagulans* et *Bacillus subtilis* (Chibi et Zerkin, 2019).

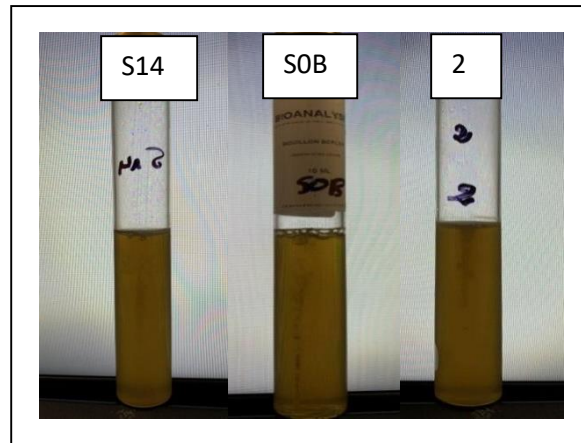


Figure 12 déterminations de type respiratoires des souches S14, S0B et 2.

-Détermination de la voie d'attaque des glucides

Le test du métabolisme des glucides révèle que la souche S0B et la souche S14 possèdent un métabolisme oxydatif, L'acidification de la surface du milieu de culture entraîne un changement de couleur visible, passant au jaune (figure 13); et la souche 2 possède un métabolisme fermentatif ce qui est traduit par une acidification rapide et égale dans les deux milieux qui deviennent jaunes en 24h sur toute la hauteur de la pique d'inoculation (figure 13).

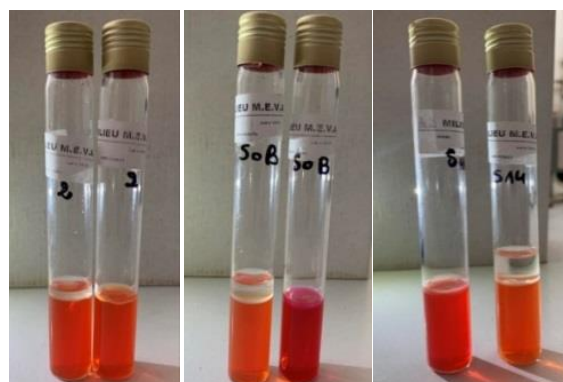


Figure 13 déterminations de la voie d'attaque des glucides des souches S0B et S14, et 2.

-Dégradation du citrate de Simmons

Le tableau 5 et la figure14 ci-dessous; présente les résultats de l'assimilation du citrate de sodium comme unique source de carbone par les souches testées. En effet, pour les souches S14 et 2 un léger virage de la couleur verte vers la couleur bleu a été observée. Cependant la bactérie S0B n'a montré aucun changement de couleur. Dans l'étude menée par Benchabi, (2021), 9 isolats du genre *Bacillus* ont été obtenus, démontrant une utilisation variable du citrate de Simmons en fonction de l'espèce bactérienne considérée.

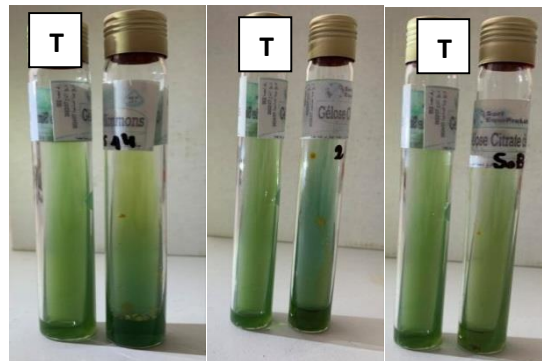


Figure 14 dégradations du citrate de Simmons par les souches S14, S0B et 2 en comparaison avec le témoin (T).

Tableau 5 utilisation de citrate de Simmons par les bactéries S14, S0B et 2.

Souche	Couleur d'origine	Couleur après inoculation	Résultat
S0B	Vert	Vert	-
S14	Vert	Bleu	+
2	Vert	Bleu	+

-Test mannitol-mobilité

La mise en évidence de la mobilité des bactéries S0B, S14 et 2 sur le milieu de culture mannitol-mobilité a été confirmée par leur diffusion sur toute la surface de la gélose (figure15). En effet, il y'a un virage de la couleur du milieu de culture vers l'orange ce qui signifie que les souches sont aptes à fermenter le mannitol. Dans une étude similaire, Hammou-Tani, (2017) a analysé 19 souches de *Bacillus* ; les observations du test de mannitol

et de mobilité ont révélé que 61,53% des bacilles étaient positifs au mannitol et 30,76% étaient mobiles.

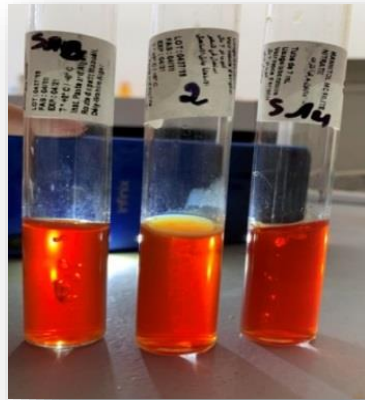


Figure 15 résultats du test mannitol mobilité des souches S14, S0B et 2

Les résultats de cette étude biochimique nous ont permis de déterminer plusieurs caractères biochimiques caractéristiques du genre *Bacillus* (Bergeys, 1994), ce qui nous a affirmé une deuxième fois les constatations faites dans les études précédentes.

4-5-Mise en fermentation

Cette étape implique la production de laccase par les trois souches de *Bacillus* en milieu liquide. La laccase est exprimée en réponse à la carence en glucose. En conséquence, les cultures ont été cultivées dans un milieu de bouillon Luria-Bertani car ce dernier ne contient pas de source de carbone.(Singh *et al.*,2014) .

4-6- Dosage de l'activité laccasique

Cette étape a pour but de déterminer l'activité laccasique des trois souches de *Bacillus* dans un milieu synthétique utilisé couramment pour les espèces du genre *Bacillus*. Le dosage de l'activité laccase effectué avec les surnageants de cultures, issus d'une fermentation de 10 jours, a montré que la production de cette enzyme est faible en comparaison à d'autres travaux similaires comme celui de Singh *et al.*, (2014). En effet, l'activité laccasique des souches S0B, S14 et 2 est: 1,24 UI/L 1,17 UI/L et 1,68 UI/L respectivement. Le taux faible de production est, peut-être, dû aux conditions de culture suivies pour la fermentation qui n'ont pas permis aux bactéries d'arriver à l'activité enzymatique attendue. Des études précédentes ont montré que l'ajout d'un agent inducteur de production, tel que le CaCl_2 , peut améliorer nettement la production de laccase dans le milieu de fermentation (Nadeem *et al.*,2014).Aussi,

l'utilisation de milieu de culture naturel ; à base de déchets de bananes(Facelo et Cruz, 2007), de pépins de raisin(Moldes *et al.*,2004) ou autre, aide à augmenter significativement l'activité laccasique.

4-7- Application sur la laccase

4-7-1- Dégradation des colorants synthétiques

L'objectif principal de cette application est de mettre en évidence la capacité de la laccase produite par les trois souches de *Bacillus* à dégrader des colorants synthétiques (RC), (VM), (BB) et (BM), qui représentent un grand danger pour l'environnement et pour la santé humaine en particulier, les ouvriers des industries du textile qui sont exposés d'une manière prolongée aux colorants azoïques, ce qui leur a provoqué des cancers de la vessie (Guerra *et al.*, 2018). C'est pour cette raison, qu'on s'est orienté vers l'application de la laccase dans la dégradation des colorants cités ci-dessus.

Après incubation de 3 jours à 30°C; les *Bacillus* ont montrées des résultats positifs pour certains colorants et ce, par le développement d'une zone claire autour de la zone de croissance des *Bacillus* testés (tableaux 6,7 et 8). L'apparition de cette zone signifie que la bactérie a synthétisé l'enzyme laccase qui a participé à la dégradation du colorant par voie biologique. L'étude de Ghribi,(2019) à montrer que *Paenibacillus* et *Bacillus* possèdent toutes les deux la capacité de production de laccase et la capacité de décolorer efficacement une variété de colorants synthétiques incluant le bleu de méthylène (BM) et le vert de malachite (VM). Ce résultat est conforme à celui de Benhassine *et al.*(2016), qui a montré que l'enzyme laccase d'origine microbienne est capable de dégrader clairement le milieu de culture additionné au colorants : (RC), (VM) et (BB).

La sécrétion de la laccase est, généralement, considérée comme réponse à une carence nutritive dans le milieu, de ce fait, les souches de *Bacillus* ont orienté leurs métabolisme, en recherchant une source d'énergie, vers la production de la laccase, en réponse de la présence du substrat phénolique dans le milieu .Ces constatations nous renseignent de l'efficacité de l'enzyme produite par les *Bacillus* dans la dégradation des colorants. Dans l'industrie du textile, ils utilisent, généralement, de grandes quantités d'eau et de produits chimiques pour le traitement des colorants, la structure chimique de ces derniers, fournit une résistance à la décoloration lorsqu'ils sont exposés à la lumière, à l'eau ou aux produits chimiques. En effet, l'utilisation de la laccase représente une solution idéale à cette préoccupation, car, elle

peut oxyder, à la fois, des substrats phénoliques et non phénoliques, naturels ou synthétiques (Shraddha *et al.*, 2011).

Tableau 6 résultat de dégradation des colorants synthétiques par la bactérie S0B.












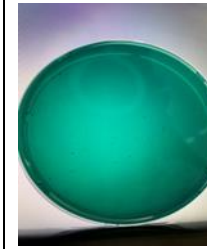







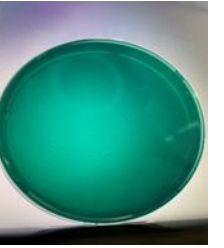

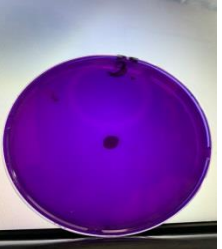
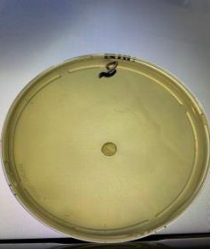
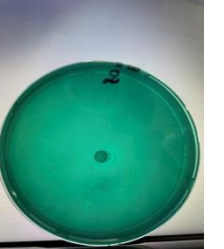
Colorants	RC	BB	BM	VM
Témoins				
Echantillons				

Tableau 7 résultat de dégradation des colorants synthétiques par la bactérie S14.

Colorants	RC	BB	BM	VM
Témoins				
Echantillons				

.Tableau 8 résultat de dégradation des colorants synthétiques par la bactérie 2.

Colorants	RC	BB	BM	VM
Témoins				
Echantillons				

4-7-1- Activité antimicrobienne

L'effet antimicrobien des trois souches de *Bacillus* a été reconfirmé une deuxième fois, cette fois ci, par le surnageant de culture qui contient l'enzyme laccase. En effet les résultats obtenus se rapprochent bien à ceux obtenus par les disques bactériens (voir section résultats-activité biologique des bactéries). Une bonne activité antifongique et antibactérienne a été observée par les surnageants de culture particulièrement contre *C. albicans*, *Aspergillus sp.* et *S. aureus* (tableau 9). Nos résultats corroborent ceux de Nayak et Choudhary, (2023) qui ont montré l'effet antimicrobien d'enzyme laccase d'origine fongique. Cependant, des études menées par Vermaet *al.* (2018) sur une laccase d'origine bactérienne a montré aussi un effet antibactérien remarquable. Peu de travaux ont traité l'effet de l'enzyme laccase contre des microorganismes pathogène pour l'Homme, le mécanisme d'action de cette enzyme contre ces pathogènes reste une piste qui nécessite des études plus approfondies.

Tableau 9 résultat du test de l'activité anti microbienne par les surnageants de culture et détermination de diamètre des zones d'inhibition.

Surnageants	Souches microbiennes				
	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Sptaphylococcus aureus</i>	<i>Escheria coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
S0B	+ (25mm)	+ (24mm)	+ (15mm)	- (00mm)	-
S14	+ (29mm)	+ (17mm)	+ (11mm)	-	-
2	+ (31mm)	+ (20mm)	+ (9mm)	-	-

+ présence de zone d'inhibition ; - absence de zone d'inhibition.

A decorative graphic of a scroll with a blue outline and grey shading on the left and right sides, framing the text.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

L'objectif de ce travail, consiste à la mise en évidence de la production d'enzyme laccase par différentes souches bactériennes telluriques appartenant au genre *Bacillus*.

L'étude de l'activité laccasique des *Bacillus* S0B, S14 et 2 vise à mettre en évidence le potentiel de production d'enzyme laccase sur milieu additionné de gaïacol. L'oxydation de ce dernier par la laccase, est traduite par l'apparition d'une couleur brune rougeâtre au niveau des colonies bactériennes.

Les tests de l'activité biologique des bactéries, a montré leurs capacité à inhiber le développement de quelques souches pathogènes pour l'Homme à savoir; *C. albicans*, *Aspergillus sp. et Staphylococcus aureus*.

L'identification des bactéries en question, basée sur un ensemble de tests macroscopiques, microscopiques (état frais, coloration de Gram et traitement thermique) et biochimiques (catalase, oxydase, nitrate réductase, voie d'attaque des glucides, type respiratoire, dégradation du citrate de Simmons, test mannitol-mobilité), a montré l'appartenance de ces souches au genre *Bacillus*.

Par ailleurs, le dosage de l'activité laccase, effectué avec les surnageants de culture, a montré que l'activité laccasique des souches S0B, S14 et 2 est: 1.24 UI/L , 1.17UI/L et 1.68 UI/L respectivement ; la production de cette enzyme est jugée faible en comparaison à d'autres travaux similaires.

Sur un autre volet, l'application de la laccase bactérienne produite dans ce travail pour la dégradation des colorants synthétiques en l'occurrence ; RG, BB, BM et VM a montré sa capacité à dégrader ces colorants synthétiques, qui représentent un grand danger pour l'environnement et pour la santé humaine. Ce résultat, nous indique que les trois souches de *Bacillus* sont capables de synthétiser l'enzyme laccase capable à son tour de dégrader les colorants par voie biologique.

Une deuxième application de laccase, en relation avec l'activité antimicrobienne, a été concrétisée par les surnageants de culture des trois souches de *Bacillus*. En effet, une bonne activité antifongique et antibactérienne a été obtenue particulièrement, contre *C. albicans* *Aspergillus sp. et S. aureus*.

Au terme de cette étude nous pouvons nous fixer les points suivants comme perspectives :

- L'identification complète, par voie moléculaire des souches S0B, S14 et 2 ;
- Etude de la production de laccase sur différents milieux synthétiques et naturels afin de valoriser certains déchets agro-industriels;
- Optimisation de la production de laccase afin d'obtenir un bon rendement ;
- Purification et identification de l'enzyme laccase par des méthodes performantes.



Résumé

Résumé

Dans cette étude, des souches bactériennes telluriques appartenant au genre *Bacillus* codées SoB, S14 et 2 ont été utilisées pour la mise en évidence pour la production d'enzyme laccase. En effet, l'étude de l'activité laccasique des *Bacillus* en question, a dévoilé la formation d'une coloration brune rougeâtre au niveau des colonies bactériennes, préalablement étalé sur un milieu caractéristique additionné par un substrat spécifique à l'enzyme laccase.

D'un autre côté, la mise en évidence de l'activité biologique des bactéries, vis-à-vis de quelques souches fongiques et bactériennes, connues comme pathogènes pour l'Homme, à montrer la capacité inhibitrice du développement de certaines souches pathogènes à savoir ; *C.albicans*, *Aspergillus sp.* et *Staphylococcus aureus*.

Par ailleurs, plusieurs études à savoir ; macroscopique, microscopique et biochimique, ont confirmé l'appartenance de ces bactéries au genre *Bacillus*. En effet, ces derniers se présentent sous forme de bâtonnets mobiles, Gram-positives, caractérisé par la formation de spores après un traitement thermique, les trois souches sont catalase +, oxydase- , nitrate réductase +, ce sont des bactéries aérobies-anaérobies facultatives. Aussi, la souche SOB et la souche S14 possèdent un métabolisme oxydatif et la souche 2 possède un métabolisme fermentatif, les deux souches S14 et 2 sont capables d'assimilées le citrate de sodium comme unique source de carbone. Enfin, les trois souches sont mobiles et aptes à fermenter le mannitol.

Sur un autre volet, le dosage de l'activité laccase effectué avec les surnageant de cultures, a montré que l'activité laccasique des souches SOB, S14 et 2 est: 1.24 UI/L , 1.17UI/L et 1.68 UI/L respectivement.

Deux applications de laccase ont été choisies pour ce travail; la première a concerné la dégradation des colorants synthétiques, et qui a montré des résultats positifs pour tous les colorants testés, ce qui signifie que les trois souches de *Bacillus* ont synthétisé l'enzyme laccase qui a participé à la dégradation du colorant par voie biologique. La deuxième application, qui a touché l'effet antimicrobien des surnageants de culture contenant l'enzyme laccase, a montré une deuxième fois une bonne activité antifongique et antibactérienne particulièrement, contre *C. albicans* et *S. aureus*.

Mots clés : *Bacillus sp.* , Laccase, Activité antimicrobienne, activité laccasique, applications.



Abstract

Abstract

In this study, telluric bacterial strains from the *Bacillus* genus, coded SoB, S14, and 2, were used to demonstrate the production of laccase enzyme.

Indeed, the study of the laccase activity of the *Bacillus* strains in question revealed the formation of a reddish-brown coloration on the bacterial colonies, which were previously spread on a characteristic medium supplemented with a specific substrate for the laccase enzyme.

On the other hand, the biological activity of the bacteria was demonstrated against several fungal and bacterial strains known to be pathogenic to humans, showing the inhibitory capacity of certain pathogenic strains, including *C. albicans*, *Aspergillus* sp., and *Staphylococcus aureus*.

Several studies, including macroscopic, microscopic, and biochemical ones, confirmed the affiliation of these bacteria to the *Bacillus* genus. These bacteria are characterized by their mobile rod shape, Gram-positive nature, and the formation of spores after thermal treatment. They are catalase-positive, oxidase-negative, nitrate-reducing, and facultative aerobes-anaerobes. Additionally, the S0B and S14 strains possess an oxidative metabolism, while the S2 strain has a fermentative metabolism. The S14 and S2 strains are capable of assimilating sodium citrate as a unique source of carbon. Finally, all three strains are mobile and capable of fermenting mannitol.

Regarding the dosage of laccase activity using culture supernatants, it was shown that the laccase activity of the SoB, S14, and S2 strains is 1.24 UI/L, 1.17 UI/L et 1.68 UI/L, respectively.

Two applications of laccase were chosen for this work: the first involved the degradation of synthetic dyes, which showed positive results for all tested dyes, indicating that the three *Bacillus* strains synthesized the laccase enzyme, which participated in the biological degradation of the dye. The second application, which focused on the antimicrobial effects of culture supernatants containing the laccase enzyme, showed good antifungal and antibacterial activity, particularly against *C. albicans* and *S. aureus*.

Keywords: *Bacillus* sp., Laccase, Antimicrobial activity, Laccase activity, Applications

ملخص

في هذه الدراسة، تم استخدام سلالات بكتيرية تيلوريكية من جنس *Bacillus*، مشفرة S14، SoB، و2، لإثبات إنتاج إنزيم اللاكيز.

في الواقع، كشفت دراسة نشاط اللاكيز لسلالات العصوية المعنية عن تكوين لون بني محمر على المستعمرات البكتيرية، والتي كانت منتشرة سابقاً على وسط مميز مكمل بركيزة محددة لإنزيم اللاكيز.

من ناحية أخرى، تم إثبات النشاط البيولوجي للبكتيريا ضد العديد من السلالات الفطرية والبكتيرية المعروفة بأنها مسببة للأمراض للإنسان، مما يدل على القدرة المثبطة لبعض السلالات المسببة للأمراض، بما في ذلك *C. albicans*، *Aspergillus sp.*، و *Staphylococcus aureus*.

وقد أكدت العديد من الدراسات، بما فيها العيانية والمجهرية والكيميائية الحيوية، انتماء هذه البكتيريا إلى جنس *Bacillus*. وتتميز هذه البكتيريا بشكلها العصي المتحرك وطبيعتها الموجبة لصبغة جرام وتكوين الجراثيم بعد المعالجة الحرارية. وهي إيجابية الكاتلاز، وأكسيديز سلبية، والحد من النترات، والهوائية اللاهوائية الاختيارية. بالإضافة إلى ذلك، تمتلك سلالات S14 و S0B استقلالاً مؤكسداً، بينما تمتلك سلالة S2 استقلالاً متخمرًا. سلالات S14 و S2 قادرة على استيعاب سترات الصوديوم كمصدر فريد للكربون. وأخيراً، فإن السلالات الثلاث متحركة وقادرة على تخمير المانيتول.

فيما يتعلق بجرعة نشاط اللاكيز باستخدام طاف الثقافة، فقد تبين أن نشاط اللاكيز لسلالات SoB و S14 و S2 هو 1.24 UI/L t 1.68 UI/L et 1.17 UI/L ، على التوالي.

تم اختيار تطبيقين من اللاكيز لهذا العمل: الأول يتعلق بتحلل الأصباغ الاصطناعية، والذي أظهر نتائج إيجابية لجميع الأصباغ التي تم اختبارها، مما يشير إلى أن سلالات العصوية الثلاث قامت بتصنيع إنزيم اللاكيز، الذي شارك في التحلل البيولوجي للصبغة. أظهر التطبيق الثاني، الذي ركز على التأثيرات المضادة للميكروبات لطاف المزرعة التي تحتوي على إنزيم اللاكيز، نشاطاً جيداً مضاداً للفطريات والبكتيريا، خاصة ضد *C. albicans* و *S. aureus*.

الكلمات المفتاحية: *Bacillus sp.*، لاكاز، النشاط المضاد للميكروبات، نشاط لاكاز، تطبيقات

A decorative border resembling a scroll, with a blue outline and grey shaded areas at the corners, framing the text.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Abe,T.,AnneMarie,k.,Justine,B.A.,Moussa,S.,Koiamé,S.K.,2018.Caractérisation phénotypue de 52 souches des bacillus isolées à partir de racines fraîches de manioc cultivé en Côte d'Ivoire.International Journal of Biological and chemical science 12(5),2284.<https://doi.org/10.4314/ijbcs.v12i5.28>.
2. Allal,w.,Bourazi,F.W.,Djoughri,D,2023.les enzymes à intérêts industriels.Mémoire.science de la nature et de la vie.Guelma: Université 8 Mai 1945.
3. Aouadhi,C.,Mejri,A.M.,Maaroufi,A.,2014. Typage moléculaire par REP- PCR des bactéries aérobie sporulées isolées de produit lactière.Revue F.S.B.
4. Bahnes,F.,komichi,S,2021. Approche bioinformatique pour l'analyse et l'identification moléculaire d'une bactérie de genre Bacillus.Mémoire.Science de la nature et de la vie.Mostaganem: université Abdelhamid ibn badis
5. Balouiri,M.,Bouhdid,S.,Harki,E.H.,sadiki,M.,Ouedrhiri,W.,Ibn Souda,S.K.,2015.Antifungal Activity of Bacillus spp.Isolated from Calotropis procera Ait.Rhizosphere against Candida Albicans.Asian Journal of pharmaceutical and clinical research8,213-217
6. Belabbes,A.C.,Akerma,M,2019 étude de la thermoresistance de bacillus cereus sensu lato isolées à partir des épices de harira dans la région de Ain Témouchent.Mémoire.Science de la nature et de la vie.Ain Témouchent : centre universitaire Belhadj Bouchaib.
7. Ben harzaallah,S,2021. Les micro-organismes halophiles producteurs de la cellulase dans les régions de Biskra.Mémoire.Science de la nature et de la vie.Biskra : université Mohamed Khider
8. Ben Maachia,S.,Errakhi,R.,Mathieu,R.,Chérif,M.,Lebrihi,A.,2011.Identification and partial characterisation of antifungal and antibacterial activities of two Bacillus Sp.Strains isolated from salt soil in Tunisia.African.J.Microbial.Res13,1599-160
9. Benchabi ,A,2021. Recherche de Bacillus carbonatogène des sites rocheux et leurs applications dans la bio-cicatrisation de matériaux cimentaires.Mémoire sciences biologiques.Constantine : université Frères Mentouri Constantine 1
10. Benhassine,S,2017. Étude de la Lacasse produite par des mycètes isolées à partir de différentes écosystèmes algériens.Thèse.Bioprocédés et Biotechnologie, applications Mycologique.Constantine: université Frères Mentouri Constantine 1

11. Bergey.,David,H.,1994.Bergey's manual of determinative bacteriology.9 th edition.William R.hensyl,USA
12. Bouaouine,A.,Gharfi,M,2015. Production de la laccase par des mycètes filamenteux sur milieu à base de déchets de citrouille (*Cucurbita* sp.). Mémoire.Science de la nature et de la vie.Constantine: université de Frères Mentouri Constantine 1
13. Chauhan, P.S.,goradia,B.,Saxena,A.,2017. Bacterial laccase : recent update on production, properties and industrial applications.3 Biotech 7,323.Dio 10.1007/s13205-017-0955-7
14. Chibi,A.,Zerkin,O.R,2019. Sélection de micro-organismes producteur de laccase en vue de la valorisation de la biomasse lignocellulosique.Mémoire.Science de la nature et de la vie.Constantine: université des Frères Mentouri Constantine 1
15. Chouini,A.,Tabouche,KH,2013. Bactériologie des fientes des hirondelles (région de Guelma).Mémoire.Science de la nature et de la vie.Guelma: université de 8 mai 1945
16. Cissé,F.,Moussa,I.O,2023. Étude de la diversité bactérienne thermophile de la source thermale de Guelma.Mémoire.Science de la nature et de la vie.Constantine: université Frères Mentouri Constantine 1
17. Contesini,F.J.,Melo,RR.,Sato,H.H.,2017. Un aperçu des protéases de *Bacillus* : de la production à l'application 38(3),321-334.[https://Doi.org/10.1080/07388551.20171354354](https://doi.org/10.1080/07388551.20171354354)
18. Cortezzi,D.E.,Setlow,P.,2005.analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals.Journal of Applied Microbiology 98,606-617.
19. Debnath, R.,Saha,T.,2020. Un aperçu des stratégies de production et des applications de l'enzyme Ligninolytique laccase à partir de bactéries et de champignons. Elsevier 26,101645.[https://dio.org/10.1016/j.bcab.2020.101645](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101645)
20. Dhouib,A,2017. Mise en évidence de la production des substances d'intérêt technologique par quelques bactéries lactiques isolées de lait de brebis.Mémoire.Science de la nature et de la vie.Khemis-Meliana: université de khemis-Meliana
21. Elguess,M.,Slimani,S.M,2022. Optimisation de la production de cellulase par des souches de *Bacillus* isolées de différentes sources.Mémoire.Science de la nature et de la vie.Biskra: Université Mohamed khider de Biskra.
22. Errakhi,R.,Bouteau F.,Lebrihi A., Barakate M,2007.Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-

- off disease in sugar beet (Beta 1608 Afr.J.Microbial.Res.vulgarisL.).World J.Microbial.Biotechnol.23 :1503-1509.
23. Faccelo,J.,Cruz,O.,Banana,S,2007.novel material for a low-cost production of laccase.Master.Graduate studies in chemical, environmental and process engineering.Rovira i Vergili:École Technique Supérieur d'Enginyeria Química,Spain
24. Farah, Ch.,Nadji,F.,daghboudj,I,2020. Potentiel enzymatique et antimicrobien des bactéries des genres Bacillus et pseudomonas .Mémoire.Science de la nature et de la vie.Tébessa: université de Larbi Tébéssi.
25. Farhat,H.,chachaty,E.,Antoun,S.,Nitenberg,G.,Zahar,J.R.,2008. Infection à bacillus et immunodépression, à propos de deux cas.Médecine et Maladies infectieuses 38(11),612-614.<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2008.09.006>
26. Gahlouz,N,2021. Isolement et caractérisation des bactéries productrices des protéases industriel.Mémoire.Science de la nature et de la vie.Tiaret: université ibn khaldoun
27. Gharsi,N.,Sekefali,H,2015. Effet antagoniste de quelques souches isolées à partir des sols sur Erwinia spp.. Mémoire.Science de la nature et de la vie.Guelma: université 8 mai 1945
28. Ghorzi,I.,Miloudi,A,2018. Isolement des souches de Bacillus.sp à partir de tube digestif des poulets de chair.Mémoire . Sciences de la nature et de la vie.Ain Témouchent : centre universitaire Belhadj Bouchaib
29. Ghribi,M,2019. La biodiversité microbienne des déchets boues papetière et huile usées et son potentiel d'application enzymatique. Biologie cellulaire et moléculaire.Québec: université de Québec à trois-rivières
30. Guerra E., Llompart M., Garcia-Jares C., (2017). Miniaturized matrix solid-phase dispersion followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantification of synthetic dyes in cosmetics and foodstuffs used or consumed by children. Journal chromatogr. A, 1529, 29–38.
31. Hadj kaddour,I.,Benaziza,A,2020. Effet de source de carbone et d'azote sur la croissance et le spectre antimicrobien de Bacillus spp..Mémoire.science de la nature et de la vie.Aïn-Témouchent: Centre universitaire Belhadj Bouchaib .
32. Hammou-tani,S,2017. Identification des bactéries formant dans de lait de vache pasteurisé.Mémoire.Controle de qualité et technologie agroalimentaire.Telemcen: université Aboubekr Belkaid.
33. Janusz, G., Pawlik, A.,Swiderska-Burek, U.,Polak, J.,Sulej, J.,Jarosz-wilkolazka, A.,Paszczyński, A.,2020.Laccase properties,Physiological Function, and

- Evolution. International journal of Molecular Sciences
21,966. <https://doi.org/10.3390/ijms21030966>
34. Khatami, S.H., Vakili, O., Movahedpour, A., Ghesmati, Z., Ghasemi, H., Taheri Anganeh, M., 2022. laccase : various type and application. *biotechnology and Applied Biochemistry* 69,2658-2672. <https://doi.org/10.1002/bab.2313>
35. Kumar, A., Sharma, S., 2019. Microbes and enzymes in soil health and bioremediation. Arora, Uttar Pradesh
36. Lanteigne Roch, L.M., 2010. Utilisation des enzymes lipase et laccase pour améliorer la blancheur d'une pâte désencrée de papier journal. Mémoire. Science de l'environnement. Québec: université de Québec à trois-rivières
37. Liu, X., Ren, B., Chen, M., Wang, H., Kokare, C.R., 2010. Production and characterisation of a group of bioemulsifiers from the marine *Bacillus velezensis* strain H3. *Appl Microbial Biotechnol* 87,1881-1893.
38. Loewen, P.C., Switala, J., 1987. Multiple catalase in *Bacillus subtilis*. *Journal of bactériologie* 169,3601-3607
39. Lu, L., Zhao, M., Wang, T.N., Zhao, L.Y., du, M.H., Li, T.L., Li, D.B., 2012. characterization and dye decolorization ability of an alkaline resistant and organic solvents tolerant laccase from *Bacillus licheniformis* LS04. *bioresource Technology*, 115,35-40. <https://Doi.org/10.1016/J.biortech.2011.07.111>
40. Madigan, M.T., Martino, J.m., 2006. Brock biologie of microorganisms. 11th ed. Pearson. upper saddle river, NJ, USA
41. Makonge, F.E., 2019. Optimisation de la production de protéase par *Bacillus* sp. ayant un effet contre candidat albicans. Mémoire. Science de la nature et de la cie. Contantine: université Frères Mentouri Constantine 1
42. Mazhar, H., Abbas, N., Ali, S., Sohail, A., Hussein, Z., Shahid Ali, S., 2017. Production optimisée de lipase à partir de *bacillus subtilis* PCSIRNL-39. *Journal Africain de Biotechnologie* 16(19),1106-1115. <https://Doi.org/10.5897/AJB2017.15924>
43. Medan, H., 2017. Identification et caractérisation de la thermoresistance des spores *Bacillus cereus* isolées de la poudre de cacao. Mémoire. Science des aliments. Tlemcen: université Aboubekr Belkaid
44. Mezani, L., Meziani, W., 2022. Caractérisation des bactéries halotolérantes isolée à partir d'une sebkha au nord. *Biotechnologie*. Tizi-ouzou: université Mouloud Mammeri.

45. Moldes,D.,Lorenzo,M.,Sanroman,M.A.,2004. différence proportion des iso enzymes de laccase produits par des cultures submergées de trametes versicolor cultivé sur les déchets lignocellulosiques *Biotechnal Lett* 26,327-330
46. Mtibaa,R.,2019. Isolement et études de souche fongiques thermotolérantes productrices de laccase à partir de sols des régions arides du sud tunisien: Essai d'application en biomédiation .Thèse.Génie biologique.sfax: école nationale d'ingénieurs de sfax
47. Nadeem,A.,Baig,S.,Sheikh,N.,2014.Mycotechnological production of laccase by pleurotus *Ostreatus* and its inhibition study.*The Journal of Animal and plant sciences* 24(2),492502
48. Nayak,B.,choudhary,R.,2023.Antimicrobial potential of fungal laccase isolated from lignocellulolyticwastesoil.*Eco.Env.&Cons*29,s17s20.<http://doi.org/10.53550/EEC.2023.v29isp1.005>
49. ROCHEFORT. D,2001. Étude des réactions enzymatiques et électrochimiques impliquées dans le bioblanchiment de la pâte à papier. Thèse de doctorat. Département de chimie. Montréal : Université de Montréal .
50. Sedrati,S.,Harrag,M,2016. Intérêt biotechnologique des souches fongiques sécrétant de la laccase.Mémoire.Science de la nature et de la vie.Constantine: université Frères Mentouri Constantine 1
51. Shraddha.,Shekher,R.,Sehgal,S.,Kamthamia,M.,Kumar,A.,2011.Laccase:microbial sources, Production, Purification,and potential biotechnological application.*Enzyme Res* 2011,1,217861.DOI 10.4061/2011/217861
52. Singh,D.,Narang,E.,Chutani,P.,Kumar,A.,Sharma,K.K.,Dhar,M.,Viridi,J.S.,2014.isolation, Caractérisation and production of bacterial laccase from *Bacillus* sp.*Microbial diversity and biotechnology in food security* 7,439.DOI 10.1007/978-81-322-1601-2_39
53. Soleil,Y.,De Vos,P.,Heylen,K.,2016. Émission d'oxyde nitreux par l'ammonificateur de nitrate non dénitrifiant *Bacillus licheniformis*.*BMC Genomics*17(68).DOI 10.1186/s128664-016-2382-2
54. Verma,A.,Shirkot,P.,Dhiman,K.,Sharma,R.,Chauhan,A.,2018.First Evidence of a Potential Antimicrobial Activity of BacterialLaccase Against Various Plant Pathogens.*GrossMark* 42,58.<https://doi.org/10.1007/s40009-018-0695-1>

55. Vos,P.,Garrity,G.,Jones,D.,krieg,N.R.,Ludwig,W.,Rainey,F.A.,Schleifer,K.H.,whitman,W.B.,2011.Les Firmicutes.Manuel de Bergey de bactériologie systématique 3.DoI 10.1007/b92997
56. Xinming,X,2023 Quantitative ecology of Bacilli and associated soil microorganisms.Thèse. technology and departments of Biotechnology and Biomedicine.Denmark: Technical university of Denmark
57. Youcef-Ali,M,2014. Étude de l'activité anti-candidat Albicans des micro-organismes isolés à partir du sol des zones arides .Thèse. Bioprocédés et Biotechnologie, Applications Mycologique.Constantine: université Frères Mentouri Constantine 1

A decorative border resembling a scroll, with a blue outline and grey shaded areas at the corners and along the left edge, suggesting a rolled-up document.

Annexes

Annexes
Composition des milieux de culture
Milieu LMBG

Peptone.....	3g
Glucose.....	10g
KH ₂ PO ₄	0.6g
ZnSO ₄	0.001g
K ₂ HPO ₄	0.4g
FeSO ₄	0.0005g
MgSO ₄	0.5g
MnSO ₄	0.05g
Agar.....	17g
Eau Distillée.....	1000ml

Ph = 6 à 25°C additionnée de 0.02% du Guaiacol

Stérilisation à 120°C pendant 15 minutes .

Milieu LB

Extrait de levure	5g
Peptone.....	10g
NaCl.....	10g
Agar.....	20g
Eau Distillée	1000ml

Milieu réactionnel (l'activité laccasique)

Sodum acetate 0.1 M /ph=6.....	4.8ml
Guaiacol (0.001).....	0.1ml

Milieu Gélose nutritive

Gélose nutritive ou gélose nutritive ordinaire (GNO) ou encore gélose ordinaire, est un milieu d'isolement non-sélectif dont la composition chimique théorique en g/L d'eau purifiée est :

Peptone	10g
Extrait de viande.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Gélose	15g

pH 7.2, autoclave 20 minutes à 120°C

1-5 Milieu Gélose Sabouraud

La gélose Sabouraud est un milieu recommandé pour la culture des champignons. La composition chimique théorique de ce milieu en g/L d'eau purifiée est :

Peptone de viande (bovin ou porcin).....	3g
Peptone de caséine (bovin).....	3g
Peptone de soja.....	3g
Extrait de levure	2g
Extrait de malt.....	1g
Glucose	19g
Phosphate monopotassique	0.5g
Phosphate disodique.....	0.5g
Agar.....	13g

Le pH est de 6.4. La présence de trois peptones et du glucose, ainsi que le pH acide du milieu favorisent la croissance des levures et des moisissures.

Année universitaire : 2023-2024

Présenté par : Chertioui Soundous

Dellal Souheila

Mise en évidence de la production d'enzyme laccase par différentes souches de *Bacillus*

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie et Hygiène hospitalière

Résumé

Dans cette étude, des souches bactériennes telluriques appartenant au genre *Bacillus* codées SoB, S14 et 2 ont été utilisées pour la mise en évidence pour la production d'enzyme laccase. En effet, l'étude de l'activité laccasique des *Bacillus* en question, a dévoilé la formation d'une coloration brune rougeâtre au niveau des colonies bactériennes, préalablement étalé sur un milieu caractéristique additionné par un substrat spécifique à l'enzyme laccase.

D'un autre coté, la mise en évidence de l'activité biologique des bactéries, vis-à-vis de quelques souches fongiques et bactériennes, connues comme pathogènes pour l'Homme, à montrer la capacité inhibitrice du développement de certaines souches pathogènes à savoir ; *C.albicans*, *Aspergillus sp.* et *Staphylococcus aureus*.

Par ailleurs, plusieurs études à savoir ; macroscopique, microscopique et biochimique, ont confirmé l'appartenance de ces bactéries au genre *Bacillus*. En effet, ces derniers se présentent sous forme de bâtonnets mobiles, Gram-positives, caractérisé par la formation de spores après un traitement thermique, les trois souches sont catalase +, oxydase-, nitrate réductase +, se sont des bactéries aérobies-anaérobies facultatives. Aussi, la souche S0B et la souche S14 possèdent un métabolisme oxydatif et la souche 2 possède un métabolisme fermentatif, les deux souches S14 et 2 sont capables d'assimilées le citrate de sodium comme unique source de carbone. Enfin, les trois souches sont mobiles et aptes à fermenter le mannitol.

Sur un autre volet, le dosage de l'activité laccase effectué avec les surnageant de cultures, a montré que l'activité laccasique des souches S0B, S14 et 2 est: 1.24 UI/L , 1.17UI/L et 1.68 UI/L respectivement.

Deux applications de laccase ont été choisies pour ce travail; la première a concerné la dégradation des colorants synthétiques, et qui a montré des résultats positifs pour tous les colorants testés, ce qui signifie que les trois souches de *Bacillus* ont synthétisé l'enzyme laccase qui a participé à la dégradation du colorant par voie biologique. La deuxième application, qui a touché l'effet antimicrobien des surnageants de culture contenant l'enzyme laccase, a montré une deuxième fois une bonne activité antifongique et antibactérienne particulièrement, contre *C. albicans* et *S. aureus*.

Mots-clefs : *Bacillus sp.* , Laccase, Activité antimicrobienne, activité laccasique, applications

Laboratoires de recherche : Laboratoire N°14, Faculté SNV (U Constantine 1 Frères Mentouri).

Président du jury : Dr Harzallah Basma (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : Dr Youcef-Ali Mounia (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Examineur : Dr Chentli Amira (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).