REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE YAHIA FARES MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master 2

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologique

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé :

Evaluation de l'activité enzymatique des souches thermophiles isolées à partir des sources thermales dans les wilayas de Médéa, Bouira et Ain defla

Présenté par :

ATSAMNIA Abdelouahab

BENBOUALI Adel

LAOUAMRIA Ilhem

Soutenue publiquement le 15 Juillet 2021 devant le jury composé de :

Président	**BOUCELKHA A.**	**Maître de conférences B**	**Université de Médéa**
Examinatrice	**ZERGOUG A.**	**Maître de conférences B**	**Université de Médéa**
Promotrice	**HOCEINI A.**	**Maître de conférences B**	**Université de Médéa**

Année universitaire : 2020/2021

Remerciement

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

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

Nous tenons aussi à remercier notre enseignant Monsieur ***BOUCELKHA A.*** *pour avoir accepter de Présider les membres du Jury. Votre largesse d'esprit nous a été d'un aide précieuse.*

Nos remercîments également à notre enseignante ***ZERGOUG Amina*** *d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

Nos vifs remerciements vont, également à tout le personnel de laboratoire Microbiologie précisément ***Mr. TOUFIK, OTHMANE***
Mme TIFFOURA, SAIDA, Faiza et Fatima *pour leurs aides et surtout pour leurs gentillesses.*

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

Et bien sûr sans oublier de remercie tous les étudiants de la promotion Master 2 Microbiologie Appliquée 2020/2021.

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

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mon adorable femme, ***Maman*** *: mon précieux offre du dieu, qui quoi que je fasse et je dise, je ne saurai point se remercier comme elle se doit. Son affection me couvre, sa bienveillance me guide et sa présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

A la mémoire de mon père ***BENBOUALI Ahmed*** *- رحمه الله -*
Celui qui a quitté le monde sans adieu ni retour à celui dont le corps était couvert de poussière et m'a privé des tons de sa voix. Esprit pur de mon père, que Dieu ait pitié de lui, et qu'il demeurera dans ses vastes paradis.

A ***ma grande mère****, ma Deuxième maman, sans vous, je ne serais jamais là maintenant, Que Dieu te donne santé et longue vie.*

A mon brave frère ***Med Amine****, A ma charmante sœur* ***Amina*** *et ma belle-sœur* ***Rekia****. A toute ma famille dont le soutien et les encouragements m'ont été salutaires.*

A mon chère petit beau neveu, ***LOUAY.***

A mes chères Trinômes ***Abdelouahab*** *et* ***ILhem*** *vous êtes les meilleurs.*

A tous mes AMIS particulièrement ***** *KASYSMEN* *****

*A l'équipe * MC CHEESE**

A tous mes enseignants et mes collègues de spécialité Microbiologie appliquée 2020/2021

A tous ce qui m'aiment..

ADEL..

Dédicace

A mon très cher ***père*** *pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour, pour son amour, Et ses encouragements. Que ce travail, soit pour vous. Qu'ALLAH le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur et te protège de tout mal.*

A la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; ma très chère ***mère*** *Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Qu'ALLAH te protège et te donne la santé, le bonheur et longue vie.*

À la mémoire de ma ***grand-mère*** *; que dieu vous accorde sa miséricorde.*

A mes frères ***Mohamed*** *et* ***Raouf*** *que j'aime tant Pour leur petit mot et leur soutien.*

la jumelle de mon âme, ma sœur ***Zola*** *et son mari* ***Smail*** *ainsi leurs petites adorables filles* ***Yasmine ,Ines et Lyna*** *que Dieu les protège et les prête la bonne santé et une longue vie.*

À mes ***oncles, tantes, cousins*** *et* ***cousines * Yussra et Zahra * ;*** *en témoignage de mon amour, de mon Profond respect et de ma reconnaissance.*

A mes chères Trinômes ***Abdelouahab*** *et* ***ADEL*** *vous êtes les meilleurs.*

je dédie ce travail à toutes mes copines ***Maroua, Hafsa, Abla, Chaima, Zineb, Lamia,*** *qui m'ont toujours encouragé, poussé et motivé dans mes études.*

*A toute l'équipe de PHARMACIE ** ***Ibn Baytar ****

ILHEM..

Dédicace

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

A celle qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation et de ses dévouements……A ma chère mère

A celui qui s'est changé la nuit en jour pour m'assurer les bonnes conditions……A mon cher père

Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.

A mes chers frères ***Med.amine*** *et* ***Youcef*** *et mes chers sœurs iman et soumia et mes beaux frères Sofiane et Malik et ma belle sœur iman et ses enfants «* ***louay, lydia, lilya, iyad , mayssa, rayan*** *» et ma future femme.*

je ne pourrais jamais exprime l'attachement et l'affection qui j ai pour Vous, aucun mot ne pourrait exprimer la gratitude et l'amour qui je vous porte ….

Chers mon frère ***ADEL*** *ET ma sœur* ***ILHEM*** *avant d'être trinôme pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce travail et nos études.*

A tous mes enseignants et mes collègues de spécialité Microbiologie appliquée 2020/2021.

A tous mes amis particulièrement ***« KASYSMEN »*** *qui m'ont toujours encouragé, et a qui je souhaite plus de succès.*

A tous ce qui m'aiment..

ABDELOUAHAB..

Résumé

Les microorganismes thermophiles possèdent la capacité d'adaptation à des environnements chauds tels que les sources hydrothermales, et ils constituent une source importante des thermoenzymes, qui sont des molécules hautement thermostables présentant un grand intérêt dans le secteur industriel.

Dans le cadre de la recherche de ces molécules extracellulaires, l'isolement des souches thermophiles a été réalisé à partir d'échantillons d'eau et de sédiments prélevés au niveau de trois sites géothermaux (Hammam Elsalhin dans la région de MEDEA, Hammam K'sana dans la région de BOUIRA et Hammam Righa dans la région de AIN DEFLA).

La caractérisation phénotypiques des souches isolées à base se leurs propriétés macroscopiques, microscopiques et biochimiques nous a permis d'isoler 63 souches appartenant aux genres *Bacillus, Paenibacillus, Lysinibacillu, Geobacillus, Brevibacillus, et Aneurinibacillus.* L'évaluation de l'activité enzymatique des souches isolées a permis de trouver 38 souche amylase positif, 26 de souches cellulase positif, 14 de souches pectinase positif, 15 de souches Caseinase positif, 40 de souches estérase (T20) positif, 31 de souches estérase (T80) positif et 18 de souches est lécithines positif .

Le screening des activités hydrolytiques a permis de trouver plusieurs types d'hydrolases ayant un bon potentiel d'applicabilité industrielle.

Mots clés : thermophiles, géothermaux, thermozymes, Screening, activités hydrolytiques.

Abstract

Thermophilic microorganisms possess the ability to adapt to hot environments such as hydrothermal sources, and they are an important source of thermoenzymes, which are a highly thermostable molecules of a great interest in the industrial sector.

As part of the research of these extracellular molecules, the isolation of the thermophilic strains was carried out from water and sediment samples collected from three geothermal sites (Hammam Elsalhin in the MEDEA region, Hammam K'ana in the BOUIRA region and Hammam Righa in the AIN DEFLA region).

Phenotypic characterization of isolated strains based on their macroscopic, microscopic and biochemical properties allowed us to isolate 63 strains belonging to the genera Bacillus, Paenibacillus, Lysinibacillu, Geobacillus, Brevibacillus, and Aneurinibacillus. Evaluation of the enzymatic activity of the isolated strains yielded 38 amylase-positive strains, 26 cellulase-positive strains, 14 pectinase-positive strains, 15 Caseinase-positive strains, 40 esterase (T20) - positive strains, 31 esterase (T80) - positive strains and 18 lecithin-positive strains.

The screening of hydrolytic activities made it possible to find several types of hydrolases with good potential for industrial applicability.

Key words: thermophilic, geothermal, thermozymes, Screening, hydrolytic activities.

ملخص

الكائنات الحية الدقيقة المحبة للحرارة تمتلك القدرة على التكيف مع البيئات الساخنة مثل الينابيع المائية الحارة، وهي مصدر مهم للإنزيمات الحرارية المقاومة لدرجات الحرارة العالية والتي تعتبر ذات أهمية كبيرة في القطاع الصناعي.

في إطار البحث عن هذه الجزيئات ، تم عزل السلالات المحبة للحرارة من عينات المياه والرواسب التي تم جمعها من ثلاثة مواقع مائية (حمام الصالحين في منطقة المدية ، حمام كسانا في منطقة البويرة وحمام ريغا في منطقة عين الدفلى).

سمح لنا تعريف السلالات المعزولة بناء على خصائصها العينية والمجهرية والكيميائية الحيوية بعزل 63 سلالة تنتمي إلى الأجناس *Bacillus*, ، Paenibacillus، Lysinibacillu، Geobacillus، Brevibacillus ، و Aneurinibacillus. أسفر تقييم النشاط الأنزيمي للسلالات المعزولة من إيجاد 38 سلالة تحتوي على إنزيم الأميليز ، و 26 سلالة تحتوي على إنزيم السليلاز ، و 14 سلالة تحتوي على إنزيم البكتيناز ، و 15 سلالة تحتوي على إنزيم الكازيناز ، و 40 سلالة تحتوي على إنزيم الاستراز (T20) ، و 31 سلالة تحتوي على إنزيم الاستراز (T80) ، و 18 سلالة تحتوي على إنزيم الليسيثين.

مكّن البحث عن وجود الإنزيمات المحللة من العثور على عدة أنواع من هذه الإنزيمات القابلة للاستخدام في المجال الصناعي.

الكلمات المفتاحية: المحبة للحرارة ، الحرارية الأرضية ، الإنزيمات الحرارية ، الفحص ، الأنشطة المائية.

Table De Matière

Liste des tableaux
Liste des figures
Liste des abréviations
Introduction 1
Chapitre 1. Les extrêmophiles 3
I.1 Les microorganismes extrêmophiles 3
I. 2. La diversité des extrêmophiles 4
I.2.1 Les microorganismes extrêmophiles et la température 4
I.2.2. Microorganismes alcalophiles et acidophiles 5
I.2.3 Microorganismes halophiles 6
I.3 Intérêt des extrêmophiles 7
Chapitre II .Les bactéries thermophiles 8
II.1 Diversité (phylogenie) des thermophiles 8
II.1.1 -Bactéries 8
II.1.2 -Archaea 8
II.1.3 -Eucarya 8
II.2. Définition des thermophiles 9
II.2.1 Les principales bactéries thermophiles 10
II.2.2 Besoins nutritifs des bactéries thermophiles 10
II.2.3 Les avantages des thermophiles 11
II.3 Les niches écologiques : 12
II.3.1 Biotopes naturels : 12
II.3.2 Biotopes artificiels : 13
II.4 Les bactéries des sources hydrothermales : 14
II.5 Quelques travaux d'isolement des bactéries thermophiles à partir des sources hydrothermales : 14
II.5.1 -En Algérie : 14
II.5.2-Dans d'autre pays : 16
II.6 Application des thermophiles 18
II.6.1 Applications basées sur les cellules entières: 18
II.6.2 Applications basées sur les biomolécules : 19
Chapitre III .Les Thermoenzymes 20

III.1 Les thermoenzymes : 20
III.2 Les différents enzymes : 20
III.2.1 Les amylases : 20
III.2.2 Les cellulases : 21
III.2.3 Les glucose-isomérases : 21
III.2.4 Les chitinases 21
III.2.5 Les pectinases 22
III.2.6 Les pullulanases 22
III.2.7 Enzymes de l'ADN : 23
III.2.8 Enzymes de dégradation et de modification des polysaccharides : 23
III.2.9 Protéases : 23
III.2.10 Lipases : 23
III.3 Applications biotechnologiques des enzymes protéolytiques : 24
III.3.1 Détergence : 24
III.3.2 Tannerie et traitement du cuir : 24
III.3.3 Récupération de l'argent : 25
III.3.4 Industrie pharmaceutique : 25
III.3.5 Traitement des eaux usées et des rejets industrielles : 26
III.3.6 Traitement de la soie : 26
III.3.7 Industrie alimentaire : 26
III.3.8 Synthèse de peptides : 27
Partie Expérimentale 28
I .Materiel 28
I.1. Verrerie 28
I.2. Appareillage 28
I.3. Milieux culture 28
I.4. Autres produits consommables 28
I.5. Autres matériel : 28
II. Méthode 29
II.1 Objectif 29
II .2 période et site de prélèvement 29
II.2.1. -Source thermale de MEDEA (Hammam Essalihine) 29
II.2.2. -Source thermale de BOUIRA (Hammam K'sana) 30
II.2.3. -Source thermale de AIN DEFLA(Hammam Righa) 30

II.3 Méthode de prélèvement 31
II.4. Acheminement des prélèvements 32
II.5 Analyse des prélèvements 32
II.5.1. Enrichissement, préparation des dilutions et ensemencement 32
II.5.2. Isolement, identification et conservation des isolats 33
II.5.3. Mise en évidence des enzymes hydrolytiques extracellulaires 36
Résultats et discussion 38
II.1 Isolement et purification des isolats 38
II.1.1 Caractérisation phénotypique des souches isolées des trois sites 38
II.2.Identification des souches : 55
II.3. L'activité enzymatique 57
II.4. Les activités enzymatiques des souches identifiées: 60
Conclusion 64

Liste
Des figures
Des tableaux
Des abréviations

Liste des figures

Figure 1 : Effet de la température sur les taux de croissance de microorganismes: psychrophiles, mésophiles, thermophiles, hyperthermophiles et hyperthermophiles extrêmes (Madigan et Martinko, 2007)..... 5

Figure 2 : Terminologie des extrêmophiles en fonction de la température (axe des X) et du pH (axe des Y) (Quérellou et Guézennec, 2010)..... 6

Figure 3: Eruption d'un geyser dans le parc national de Yellowstone, Wyoming, USA (Patrick, 2007).9

Figure 4: Eruption d'un geyser dans le parc national de Yellowstone,Wyoming, USA (Patrick, 2007). 10

Figure 5: fumeurs noirs, dorsale pacifique (Minic et *al*., 2006)..... 13

Figure 6 : Différentes applications de micro-organismes thermophiles (Mehta et al., 2016). 18

Figure 7: localisation site d'étude: Hammam Essalihine-MEDEA sur la carte géographique..... 29

Figure 8 : localisation de site d'étude: Hammam K'sana -BOUIRA sur la carte géographique. 30

Figure 9: localisation de site d'étude: Hammam Righa- AIN DEFLA sur la carte géographique.... 31

Figure 10: cultures des différentes souches sur GS (BA1 ;BA2 ;BA3 ;BA4 ;BA5 ;BA6 ;BA7 ;BA8 ;BA9 ;BA10 ;BA11 ;BA12 ;BA13 ;BA14 ;BA15 ;BA 16B ;A17)..... 39

Figure 11: aspects macroscopiques des souches sélectionnées (I3, I5, I6, I10, I15', I17', I18)..... 40

Figure 12: Aspects macroscopique des souches sélectionnées. (W1 - w15) (H1, H2, H4, H5, H7, H8, H10, H12, H13, H14) 41

Figure 13 : Observation au microscope (x100) ; Coloration de Gram des souches (BA5 ,BA6,BA7,BA9,BA10,BA11,BA12,BA17)) 44

Figure 14: Observation au microscope photonique (x100). Coloration de Gram.(I1, I3, I4, I5, I6, I10, I15', I17', I18) 45

Figure 15: Aspects microscopique des souches sélectionnées (W1 – W15) (H1 – H1(Coloration de Gram x100)..... 46

Figure 16 : Test oxydase des souches (+/-) 49

Figure 18 : Test nitrate réductase (H7, H8, H12, H14)..... 49

Figure 17 **:** Test catalase (I17' A8) 49

Figure 19: Galerie Api20E, appliquée sur les différentes souches (I1, I2, I4, I5, I6, I10, I15', I17', I18 w1, w5.) 52

Figure 20 : Capture d'écran de l'affichage du programme d'identification bactérienne Online -ABIS- 54

Figure 21:Amidon W4 – / W5 + Figure 22: CMC W7 – / W8 + ... 57

Figure 23 :Jaune d'œuf W12 – / W13 + Figure 24: T 20 W1 + / W2 – 57

Figure 25 :T 80 W9 – / W10 + ... 58

Liste des tableaux

Tableau 1 : Microorganismes extrêmophiles et leurs environnements Adapté (Horikoshi et Bull, 2011)..... 3
Tableau 2: Les températures et la nature des prélèvements issus des trois sites hydrothermales. 32
Tableau 3 : Caractérisations culturale et cellulaire des isolats (H.Essalhine). 39
Tableau 4: l'aspect macroscopique des isolats(H.Righa). 40
Tableau 5 **:** l'aspect macroscopique des isolats (H.K'sana). 42
Tableau 6: Caractérisations microscopique des isolats (H.Essalhine). 44
Tableau 7: caractérisation cellulaire des isolats (H.Righa). 45
Tableau 8: caractérisation cellulaire des isolats (H.K'sana)..... 47
Tableau 9 :test biochimique oxydase catalase des isolats (H.Essalhine). 49
Tableau 10 : caractérisation biochimique des isolats (H.Righa) 50
Tableau 11 **:** caractérisation biochimique des isolats (H.K'sana) 51
Tableau 12 : résultats des 3 sites de la galerie API 20E. 52
Tableau 13 : Identification des souches..... 55
Tableau 14 : Caractérisation biochimique des isolats des trois sites. 58
Tableau 15 : Les activités enzymatiques des souches identifiées 60

Liste des abréviations

A : Adénine

AAF :Aeroanaérobiefacultatif

ADH : Arginine Dihydrolase

ADN :Acide Désoxyribonucléique

API : Analytical Profile Index

Arg : Arginine

ARNr SSU : Acide Ribonucléique ribosomique Smale Sous Unites

AS : Aérobie Stricte

Asn : Aspargine

ATP : Adénosine Triphosphate

BN : Bouillon Nutritive

C : Cytosine

Chl : Chlorophylle

CIT : Citrate

CMC : Carboxyméthylcellulose

CoA : Coenzyme A

Cys : Cystéine

DPGc : diphosphoglycérate cyclique

FAP : Phototrophes Anoxygéniques Filamenteux

G : Guanine

GEL : Gélatine

Gln : Glutamine

IND : Indole

LDC : Lysine Décarboxylase

Lys : Lysine

Met: Methionine

MT162M: MODIFIED THERMUS 162 MEDIUM

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

ODC : Ornithine Décarboxylase

OGT : Température de croissance optimale modérée

p/v : poids par volume

PCR : Polymérase Chain Réaction

PH : potentiel d'hydrogène

T : Thiamine

T162M : THERMUS 162MEDIUM

TDA : Tryptophane Désaminase

TTM: THERMUS THERMUPHILUS

Tyr: Tyrosine

U: Uracile

URE : Uréase

VP : Vogues Proskauer.

EC: Est le sigle d'Enzyme Commission numbers, la Commission des enzymes.

Introduction

Introduction

Jusqu'au 20eme siècle, on pensait que la vie n'était possible que dans un environnement normal qui présente des conditions compatibles avec la vie de l'homme, puis, les chercheurs ont commencé à découvrir que certains environnements extrêmes tels que les régions volcaniques, les océans polaires, les lacs salés, les milieux alcalins ou acides et les sources hydrothermales, Cependant, ces sources n'ont été que très peu étudiées d'un point de vue biodiversité et ce n'est que récemment qu'on a commencé à s'intéresser aux microorganismes habitants ces environnements locaux **(Kecha et *al.*, 2007 ; BouananeDarenfed et *al*., 2011).** C'est le cas de Thomas Brock qui, dans les années 60, a trouvé une espèce thermophile importante dans l'avancement de la biologie moléculaire : *Thermus aquaticus.* Cette espèce a été découverte dans les sources thermales du Parc de Yellowstone aux États-Unis, c'est une source de la célèbre enzyme Taq polymérase, utilisée pour l'élongation des brins d'ADN à haute température au cours de la Polymérase Chain Réaction (PCR) **(Podar et Reysenbach, 2006).**

Parmi ces extrémophiles, les bactéries thermophiles qui habitent principalement les sources chaudes, vivent et survivent à des températures élevées, elles ont été moins explorées en raison de difficultés d'isolement et de maintien en culture pure **(Panda et *al*., 2013).** Leur étude est devenue un domaine de recherche majeure dont plusieurs nouveaux genres et espèces thermophiles ont été récemment décrites en raison de leur capacité à produire des molécules d'intérêt biotechnologique comme les enzymes thermostables **(Aanniz et *al.*, 2015).**

Dans le scénario actuel de changement climatique mondial, il existe une demande colossale de proceccus industriels durables et enzymes des thermophiles.

De manière plausible, les thermozymes sont une boîte à outils importante, car ils sont connus pour être de nature poly-extrémophile **(kumar et a*l*, 2019).** La thermostabilité est une caractéristique de la plupart de ces enzymes disponibles pour une utilisation industrielle **(Asad et *al*, 2011).** Ces enzymes sont non seulement thermostables, mais aussi plus résistants aux produits chimiques que leurs homologues mésophiles qui les rendent extrêmement intéressant pour les procédés industriels **(kumar et a*l*, 2019).**

le présent travail porte alors sur l'isolement et la caractérisation phénotypique des bactéries thermophiles provenant de trois sources hydrothermales (hammam Elsalhin dans la région de MEDEA , hammam Ksana dans la région de BOUIRA et hammam Righa dans la région de Ain defla), ainsi que l'évaluation des activités enzymatiques des souches isolées.

A cet égard notre mémoire est formé par deux parties :

1-Une partie bibliographique, divisé en trois chapitres :

- Le premier chapitre intitulé par « Le monde extrémophiles », présente une généralité sur les extrémophiles, leurs diversités ainsi que une notion des sources hydrothermales avec les principales bactéries présentes dans ces sources.
- Le second chapitre nommé par «Les bactéries thermophiles», joindre tout ce qui concernant les microorganismes thermophiles, leurs phylogénies, leurs taxonomie leurs métabolismes, leurs écologie ainsi que leur besoins avec exposition des différentes applications des thermophiles et de leurs molécules.
- Le troisième chapitre intitulé par « Les thermozymes », rassemble les principales enzymes des thermophiles et leurs mécanismes de stabilité à des conditions extrêmes suivi de description des différentes applications des thermozymes en biotechnologie.

- Une partie expérimentale qui englobe deux parties :

- la partie matériel et méthodes exprimant le matériel utilisé et la démarche expérimentale adoptée pour la réalisation de ce travail à savoir :

  - Présentation des sites d'étude.
  - Méthodes de prélèvements et échantillonnages.
  - Isolement et identification des souches isolées.
  - La mise en évidence des activités enzymatiques.

- La partie consacrée aux résultats et à la discussion en donnant des résultats pertinents et clairement argumentés.

Ce travail s'achève par une conclusion générale qui permettra de tirer quelques perspectives de prolongement à ce travail.

Chapitre I :

Le monde extrêmophile

Chapitre 1. Les extrêmophiles

I.1 Les microorganismes extrêmophiles

Le terme « extrêmophiles » a été inventé pour la première fois, en 1974, par **MacELROY**, dans un journal intitulé 'Some comment on the évolution of extremophiles', il a été interprété par plusieurs façons pour enfin être associer aux microorganismes qui peuplent des niches écologiques extrêmes caractérisées par des conditions défavorables pour le développement d'une vie **[Irwin et Baird, 2004]**

La notion d'extrêmophilie est différente de celle de la résistance aux conditions extrêmes, elle implique que les cellules se développent et fonctionnent de manière optimale dans ces conditions **[Alber et *al*, 2001], C**es organismes pouvent se développer dans des environnements où les conditions extrêmes, c'est-à-dire à des températures élevées ou basses, des pH acides ou alcalins, des concentrations élevées en sel, une pression élevée, un niveau de radioactivité important, une faible concentration en nutriments, une faible activité d'eau ou un stress oxydatif important **(Tableau 1)**. Ils possèdent en conséquence des systèmes biologiques pouvant fonctionner dans ces conditions **(MacElroy, 1974; Antranikian et *al*., 2005)**

Tableau 1 : Microorganismes extrêmophiles et leurs environnements Adapté (Horikoshi et Bull, 2011).

Microorganismes extrêmophiles	Environnement favorable à la croissance
Acidophile	pH optimum de croissance < 3
Alcaliphile	pH optimum de croissance > 10
Halophile	Nécessite au moins 1M de sel pour la croissance
Hyperthermophile	Croissance optimale à des températures> 80°C
Thermophile	Croissance à des températures entre 60°C et 85°C
Eurypsychrophile (psychrotolérant)	Croissance à des températures>25°C, mais également<15°C
Stenopsychrophile (psychrophile)	Croissance à des températures entre 10°C et 20°C
Piezophile	Croissance sous haute pression—> 400 atm (40 MPa)

Endolithique	Croissance à l'intérieur des roches
Hipolithe	Croissance sur les roches et les déserts froids
Oligotrophe	Capable de croitre dans des environnements faibles en nutriments
Radiorésistant	Tolérance aux fortes concentrations de métaux lourds
Toxitolérant	Tolérance aux fortes concentrations d'agents toxiques (solvants organiques)
Xerophile	Croissance en présence d'une faible disponibilité d'eau, résistance à la dessiccation

I. 2. La diversité des extrêmophiles

I.2.1 Les microorganismes extrêmophiles et la température

La température est l'une des variables les plus important dans notre environnement. Elle influence directement ou indirectement les activités et la distribution des microorganismes.

Trois groupes sont définis selon les températures optimales de croissance: les psychrophiles (<20°C), les mésophiles (20-45°C) et les thermophiles (>50°C). La découverte dans les années 70, de microorganismes capables de se développer à des températures bien supérieures à cette limite a conduit à redéfinir et étendre la notion de thermophilie. C'est pourquoi, on distingue deux groupes majeurs de procaryotes thermophiles: les thermophiles (>60°C), et les hyperthermophiles (>80°C). Les procaryotes vivants à des températures de croissance de plus de 105°C sont considérés comme des hyperthermophiles extrêmes **(figure 1) (Madigan et Martinko, 2007).**

Ces extrêmophiles sont classés en :

- **Thermophiles** : qui se développent d'une manière optimale aux alentours de 60°C **[Nakagawa et al, 2004] (figure 1).** ils ont attiré une grande attention chez les extrémophiles car ce sont des sources thermostables des enzymes (telles que les amylases, les cellulases, les chitinases, les pectinases, xylanases, protéases, lipases et ADN polymérases) **(Mohammad et *al.*, 2017).**

- **Hyperthermophiles** : sont des thermophiles extrêmes qui présentent des optimums de croissance à des températures comprises entre 80 et 110°C **(Madigan et Martino, 2006) (figure 1).**

- **Psychrophiles** : se développent de façon optimale à des températures inférieures ou égales à 15 °C avec un maximum de croissance à 20°C, et sont incapables de croître audessus de 20 ° C **(Irwin et Baird, 2004) (figure 1).**

- **Psychrotrophes** : sont capables de se développer à des températures inférieures ou égales à 15°C, mais, leur croissance optimale est atteinte à des températures égales ou supérieures à 18°C **(Irwin et Baird, 2004).**

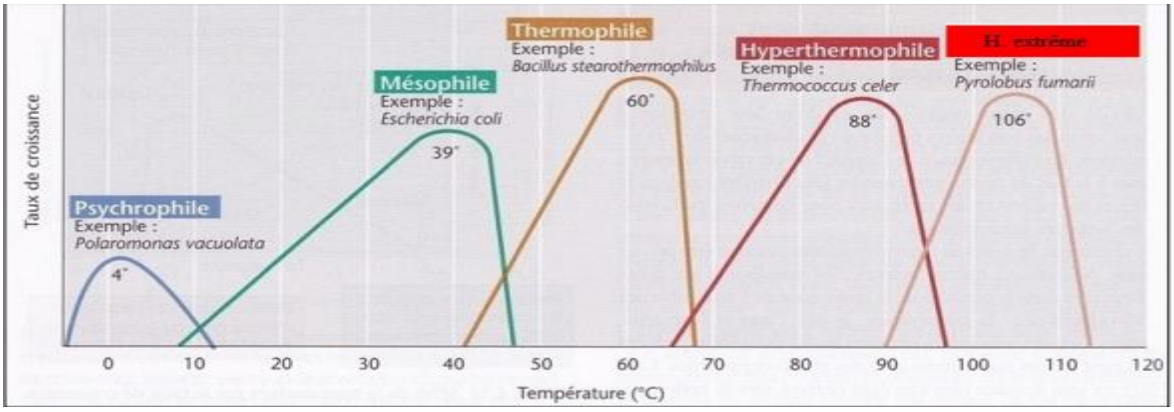


Figure 1 : Effet de la température sur les taux de croissance de microorganismes: psychrophiles, mésophiles, thermophiles, hyperthermophiles et hyperthermophiles extrêmes **(Madigan et Martinko, 2007).**

I.2.2. Microorganismes alcalophiles et acidophiles

Les microorganismes, qui ne tolèrent pas seulement des pH extrêmes, mais exigent ces conditions pour avoir un métabolisme actif sont qualifiés acidophiles et alcalophiles.

Parmi les microorganismes qualifiés d'extrêmophiles, on rencontre ceux qui se développent à des températures froides ou chaudes (psychrophiles et thermophiles), ceux qui se développent dans des milieux très acides ou basiques (acidophiles et alcaliphiles) et /ou ceux qui vivent en présence de fortes concentrations de sel (halophiles) **(figure 2)**

I.2.2.1. Microorganismes acidophiles

Les microorganismes acidophiles se développent de façon optimale à un pH égal à 2 **(Morozkina et *al.*, 2010),**

I.2.2.2. Microorganismes alcalophiles

Les microorganismes alcalophiles sont ceux qui se développent à des valeurs de pH égales ou supérieures à 9 avec un optimum entre 10 et 12, tout en montrant une croissance très faible près de la neutralité. Ces microorganismes ne se trouvent pas seulement dans des habitats à pH neutre ou alcalin, mais ils peuvent exister aussi dans des habitats acides **(Horikoshi, 1999).**

Généralement, la réponse des microorganismes, en particulier les alcalotolérants, à des pH alcalins nécessite la présence intracellulaire des ions de sodium pour la régulation et le métabolisme **(Lewinson et *al.*, 2004).**

Les produits de microorganismes alcalophiles, en particulier les enzymes, ont un potentiel industriel très important, essentiellement dans l'industrie alimentaire, l'industrie des détergents, du papier et des tissus **(Sarethy et *al.*, 2011).**

En plus des enzymes, les microorganismes alcalophiles produisent d'autres substances ayant un potentiel biotechnologique tels que les composés antimicrobiens et les caroténoïdes **[Sarethy et *al,* 2011].**

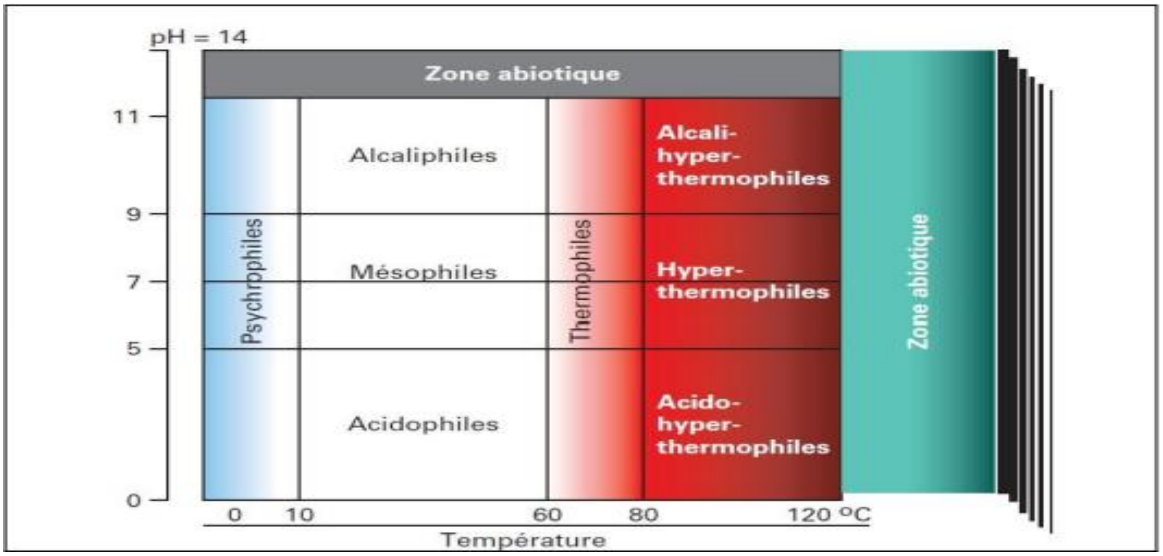


Figure 2 : Terminologie des extrêmophiles en fonction de la température (axe des X) et du pH (axe des Y) **(Quérellou et Guézennec, 2010).**

I.2.3 Microorganismes halophiles

Les bactéries halophiles sont des bactéries qui ne peuvent croître qu'en présence de sel généralement sous forme de chlorure de sodium (NaCl). Les bactéries halophiles sont classées

en trois catégories : les légèrement halophiles (optimum de croissance entre 2 et 5 % de NaCl), les modérées halophiles (optimum de croissance entre 5 et 20 % de NaCl) et les halophiles extrêmes (optimum de croissance entre 20 et 30 % de NaCl). La majorité de ces microorganismes habitent le milieu marin où la concentration est voisine de 3,5 % en sel. **(Gregoire et *al*., 2009).**

I.3 Intérêt des extrêmophiles

Les extrêmophiles ont, au cours de l'évolution, développé des stratégies adaptatives très variées.

Les extremophile permettant non seulement de survivre dans des conditions extrêmes, mais aussi de se développer souvent de manière optimale dans des niches écologiques extrêmes. **(Quérellou et Guézennec, 2010).**

L'étude des extrêmophiles fournit de nouvelles clefs à la compréhension des processus de la vie dans des conditions extrêmes et démêle les mécanismes développés par les systèmes biologiques afin d'y faire face. Ces connaissances acquises sont par la suite employées pour développer de nouveaux bioproduits et bioprocédés dans divers champs tels que les industries de produits chimiques, pharmaceutiques, de produits de beauté, de textile, de papier et alimentaire **(Antranikian, 2009)**

Chapitre II :

Les bactéries thermophiles

II.1 Diversité (phylogenie) des thermophiles

Les thermophiles sont principalement représentés dans domaine procaryote des bactéries et des archées avec quelques eucaryotes capables de pousser jusqu'à 60°C. Des thermophiles sont signalés dans les genres bactériens de *Thermus, Bacillus, Clostridium, Rhodothermus* et *Thermoanaerobacter* avec les genres archéens *de Methanobacterium* et *Thermoplasma, Aquifex, Thermotoga et Hydrogenobacter* **(kumar et *al.*, 2019). (Figure 5)**

II.1.1 -Bactéries

Les bactéries sont omniprésentes et très diverses. Ils peuvent survivre dans toutes sortes d'environnements inhospitaliers. Les bactéries thermophiles sont des microbes qui habitent principalement des sources chaudes, vivent et survivent à des températures supérieures à 70°C. Ils ont été moins explorés en raison des difficultés d'isolement et de maintien de la culture pure (**Panda et *al*, 2013).** Le défi majeur pour ces bactéries est la survie et la production d'enzymes thermostables et d'autres molécules bioactives à des températures élevées **(Alrumman et *al*, 2018). (figure 3)**

II.1.2 -Archaea

Les archées constituent un groupe de micro-organismes procaryotes qui constituent le troisième domaine phylogénétique de la vie avec le plus Bactéries et *Eukarya* bien connus. Quelques années seulement Jadis, on pensait que les archées se limitaient principalement à environnements extrêmes et anoxiques, mais il a récemment été établi que la biodiversité archéologique, abondante, la danse et les capacités métaboliques sont plus grand que le supposé précédemment **(Casamayor, 2009).**

II.1.3 -Eucarya

La thermophilie chez les eucaryotes n'est pas aussi extrême que chez les procaryotes. En général, les animaux multicellulaires et les plantes ne tolèrent pas des températures dépassant 50°C, et seules quelques espèces de mycètes et d'algues ont la capacité de prospérer à des températures modérément élevées (~60°C) **(GOMRI, 2012).**

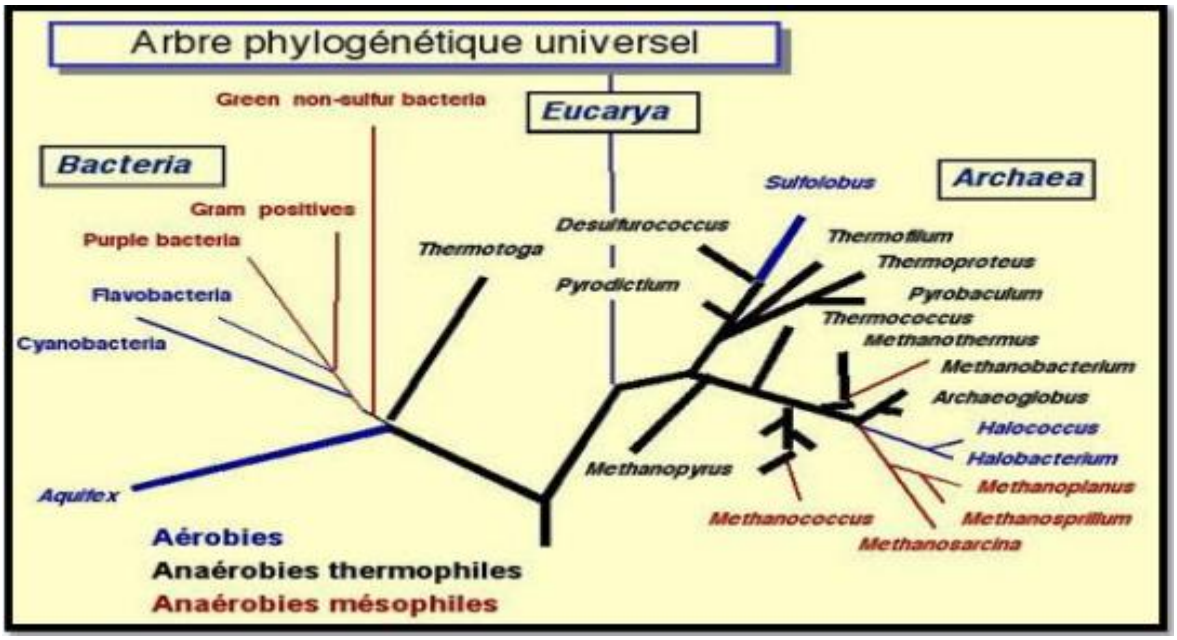


Figure 3: Eruption d'un geyser dans le parc national de Yellowstone, Wyoming, USA (Patrick, 2007).

II.2. Définition des thermophiles

Les organismes thermophiles *(du grec thermê, chaleur et philein, aimer)* sont des organismes ayant besoin d'une température élevée vivre. Ils font partie des organismes extrémophiles. Les premiers ont été découverts à la fin des années 1960 par **Thomas D. Brock** dans le parc national de Yellowstone **(Figure 4).**

Plusieurs définitions ont été proposées pour définir la thermophilie. La plus reconnue est celle qui a été proposée par Thomas Brock, le microbiologiste à l'origine de la découverte des micro-organismes thermophiles. Selon cette définition, un thermophile est un être vivant dont température optimale de croissance se situe au-dessus de 60°C.

Une définition plus pratique et plus large a été proposée par Karl Stetter et qualifie d'organismes thermophiles, tous les êtres vivants se développant à des températures supérieures à 45°C. Cette dernière définition est intéressante car elle définit 3 sous-catégories au sein des thermophiles :

-Les thermophiles modérés dont les conditions optimales de croissance se situent entre 55 et 65°C

- Les thermophiles extrêmes dont la température optimale de croissance est comprise entre 65 et 80°C

- Les hyper thermophiles dont la température optimale de croissance est supérieure à 80° **(Alain et *al.*, 2011)**



Figure 4: Eruption d'un geyser dans le parc national de Yellowstone,Wyoming, USA **(Patrick, 2007).**

II.2.1 Les principales bactéries thermophiles

*Bacillus (Bacillus stearothermophilus, Geobacillus stearothermophilus, Bacillus coagulans,), Thermus, Thermomicrobium, symbiobacterium, Clostridium (Clostridium thermocellum)***(Patrick, 2007).**

II.2.2 Besoins nutritifs des bactéries thermophiles

Les bactéries thermophiles ont parfois des besoins nutritifs particuliers voire même essentiels. Plusieurs auteurs ont rapporté ces observations, comme par exemple **Sürücü (1999).** Dans ses travaux, il expose les besoins spécifiques des thermophiles au niveau des acides aminés, des vitamines et des minéraux. La méthionine s'avérait être absolument essentielle dans ce cas, alors-que l'histidine stimulait la croissance. Les vitamines BI (thiamine) et B2 (riboflavine) stimulaient aussi la croissance. Au niveau des minéraux, le magnésium, mais aussi le calcium et le fer, semblaient très important. Ses travaux démontraient aussi un effet nutritionnel synergique dans ses cultures, car les espèces dominantes étaient moins exigeantes, sur le plan nutritionnel, en culture mixte qu'en culture pure.

L'identification de facteurs physiologiques et environnementaux qui peuvent limiter une croissance appropriée des bactéries thermophiles est importante pour les développements d'applications industrielles (p.ex. enzymes, métabolites) à partir de ces microorganismes. En effet, plusieurs réactions secondaires peuvent survenir à des températures élevées. C'est le cas

de la formation accélérée des produits de la réaction de brunissement de Maillard à de telles températures. La réaction de Maillard est la réaction entre des sucres réducteurs (p.ex. glucose) et des composés amino (p.ex. acides aminés). **Kim et Lee (2003)** ont rapporté que la croissance de l'Archaea *Aeropyrum pernix* est fortement inhibée par les produits de cette réaction. Cette conclusion n'est toutefois pas un absolu, car **Einarsson et *al*,. (1983)** mentionnent des études où les auteurs affirment que les produits de la réaction de Maillard stimulent la croissance microbienne alors que d'autres auteurs soutiennent le contraire. Un autre exemple de réaction secondaire est la conversion du L-glutamate en L-pyroglutamate, ce dernier inhibant significativement la croissance de l'Archaea *Sulfolobus solfataricus***(Park et *al.*, 2001).** Ces données supportent l'idée que la modification chimique des milieux de culture à des températures élevées soit un facteur déterminant pour la croissance efficace des thermophiles.

II.2.3 Les avantages des thermophiles

En raison des adaptations moléculaires très performantes, les microorganismes thermophiles sont très intéressants d'un point de vue biotechnologique, en particulier les systèmes enzymatiques. Les thermophiles ont surtout été utilisés par les industriels pour les caractéristiques de leurs enzymes. Plusieurs avantages sont apportés par l'utilisation de ces enzymes par rapport aux enzymes classiques.

II.2.3.1 La réduction de la viscosité

L'augmentation de la température diminue la viscosité et la tension superficielle de l'eau, ce qui a des effets bénéfiques sur la fermentation microbienne. En effet, dans les systèmes grande échelle, le flux de liquide à travers le fermenteur est souvent le facteur limitant du processus. Or avec une augmentation du taux de diffusion des substrats et une diminution de la viscosité du milieu, le flux est plus performant. Ainsi, l'efficacité du mélange est augmentée et la force à donner aux agitateurs est diminuée, on a donc besoin de moins d'énergie pour homogénéiser la culture **(Crabb et Mitchinson, 1997; Bruins et *al*, 2001).**

II.2.3.2 L'amélioration de la stérilité

Les contaminations des milieux de culture par les différents phages ou bactéries parasites sont moins fréquemment observées dans les fermentations menées à hautes températures **(Yang et *al*., 2012).**

II.2.3.3 Une diminution des coûts de refroidissement

L'activité métabolique entraîne une production de chaleur qui doit être éliminée lorsqu'on utilise des microorganismes mésophiles. Or, l'équipement réfrigérant et le transfert de chaleur représentent 10% du coût global de la fermentation microbienne. Comme les fermentations thermophiles n'ont pas besoin d'être intensément refroidies, cela constitue une économie d'énergie et diminue le coût du procédé. Lorsqu'il est conduit à haute température, le procédé devient même plus rentable puisque le processus industriel se déroule beaucoup plus rapidement s'il est engendré par des enzymes thermophiles **(Kimura et *al*, 2010).**

II.3 Les niches écologiques :

Les biotopes les plus communs dans lesquels vivent les thermophiles sont d'origine géothermique généralement associés à des zones tectoniques actives mais on les trouve également dans des biotopes chauds artificiels **(Calteau, 2005).**

II.3.1 Biotopes naturels :

Les environnements naturellement chauffés sont distribués entre les sites volcaniques terrestres (y compris les solfatares), les sources hydrothermales terrestres, les systèmes hygrothermiques sous-marins (sédiments, volcans submersibles, fumerolles), les sites souterrains, tels que les réserves de pétrole, et les sols chauffés par le soleil.

II.3.1.1 Biotopes marins :

L'eau de mer s'infiltre dans les fissures et se réchauffe au contact de la roche basaltique (ou roches profondes du manteau ou ultramaphiques) en fusion, pouvant atteindre des températures très élevées (jusqu'à 400 °C) puis, par d'autres fissures, remonte en surface. Ce fluide hydrothermal est riche en composés réduits tels que $H2S$, $CH4$, $NH4+$ ainsi qu'en éléments métalliques tels que Mn^{2+}, Fe^{2+}, $Li+$, Cd^{2+}, Cu^{2+} et Zn^{2+}. Le mélange de ce fluide avec l'eau de mer froide (2 °C) provoque la précipitation de divers sulfures métalliques et de sulfate de calcium anhydre, origine des « fumeurs » et « diffuseurs », qui constituent progressivement les cheminées hydrothermales. C'est dans cette zone de mélange turbulent, entre le fluide hydrothermal toxique surchauffé et l'eau de mer oxygénée et froide, que se développe la vie hydrothermale **(Minic et *al.*, 2006) (Figure 5).**

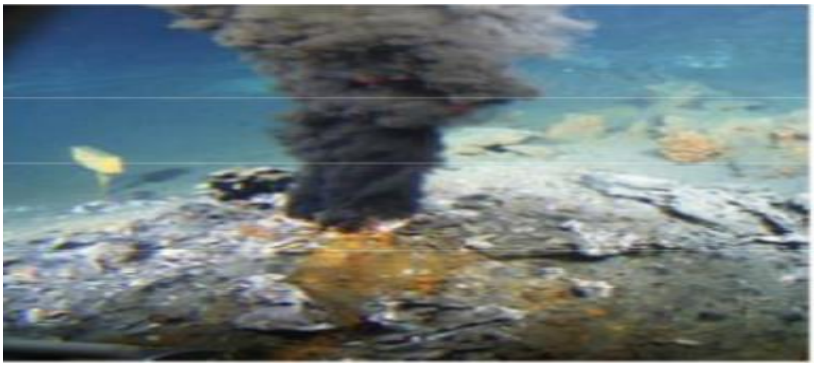


Figure 5: fumeurs noirs, dorsale pacifique **(Minic et *al*., 2006).**

II.3.1.2 Biotopes terrestres :

Dans les systèmes terrestres, lorsque l'eau surchauffée approche de la surface, la pression baisse et l'eau est projetée comme des jets ou bulles d'eau chaude connus sous le nom de geysers. Les systèmes thermiques terrestres sont retrouvés dans beaucoup d'endroits autour du monde (en Islande, dans le Parc de Yellowstone aux Etats-Unis, en Nouvelle-Zélande, au Japon, en Algérie, etc.). Leur composition en minéraux, en nutriments et leur concentration en gaz diffèrent considérablement, le pH varie de 1 à 10. Par conséquent les communautés microbiennes habitant ces régions thermiques très variées par leurs conditions physiques et géochimiques sont également très diversifiées **(Ferrera et Reysenbach, 2007).**

Il existe sur le territoire algérien plus de 240 sources thermales, réparties géographiquement entre le Nord (plus particulièrement dans les régions de l'Oranie, de la Kabylie et du Constantinois) et le Sud du pays (la région orientale du Sahara septentrional algérien) **(Ouali et *al.*, 2007 ;).** Les températures mesurées à l'émergence varient de 22°C à 98C° .Les températures les plus élevées sont enregistrées à Hammam Bouhnifia (68°C) pour la région Ouest, à Hammam El Bibans (80°C) dans la région Centre, et à Hammam Maskoutaine (98°C) pour la région Est. Dans la région Sud, certain es sources Chaudes dépassent parfois les 50°C **(Saibi, 2009).**

II.3.2 Biotopes artificiels :

Les thermophiles habitent également dans les systèmes thermiques artificiels tels que les circuits d'alimentation et les réservoirs d'eau chaude, les centrales nucléaires, les usines géothermiques, les puits et forages de pétrole, le compost et les bioréacteurs **(Ferrera et Reysenbach, 2007) .**

II.4 Les bactéries des sources hydrothermales :

Autour des sources hydrothermales, la température varie selon un gradient fluctuant, où se retrouvent différentes populations de bactéries. Certaines se développent à la température normale à environ 2 °C (bactéries psychrophiles adaptées au froid), d'autres, les mésophiles, à des températures moyennes (10-30 °C) ; enfin, certaines souches, dites thermophiles ou hyper thermophiles, se développent aux alentours de 60 °C et 100 °C respectivement **(Van den Burg, 2003).**

La plupart des bactéries de ces écosystèmes sont des Archaea. Mais on peut trouver des bactéries de type sulfo.-oxydantes (*Beggiatoa, Pyrodiciiuin, Thermococcus, Pyrococcus,Thiothrix*) , des bactéries sulfatoréductrices (*Archaegiobus*), des bactéries méthanogènes (Methanococcus) et quelques autres ayant des actions nitrifiantes et dénitrifiantes. Ces microorganismes présentent diverses caractéristiques spécifiques concernant notamment l'ARN ribosomal, les lipides, l'architecture membranaires et l'ADN, qui diffèrent de celles connues chez les autres organismes vivants procaryotes et eucaryotes. **(Minic et *al,* 2006).**

II.5 Quelques travaux d'isolement des bactéries thermophiles à partir des sources hydrothermales :

II.5.1 -En Algérie :

Les environnements chauds terrestres sont des ressources importantes pour l'isolement des micro-organismes thermophiles. Peu d'études ont été faites sur la diversité microbienne des sites géothermiques algériens. L'Algérie contient de nombreux environnements extrêmes non étudiés. Par exemple, plus de 240 sources géothermiques ont été enregistrées dans le nord de l'Algérie mais les données sur leur biodiversité sont très limitées. Ces sources pourraient être considérées comme naturellement bien protégées, renouvelables et des ressources quasi-infinies **(Fekraoui et Kedaid, 2005 ; Amarouche-Yala et *al.*, 2014),** mais peuvent, en revanche, être particulièrement vulnérables aux contaminations microbienne due aux activités humaines et à leur biodiversité pourrait être considérablement affectée **(Gomri et *al.*, 2018).** Ces sources chaudes sont utilisées pour des fins thérapeutiques depuis l'Antiquité. Ils ont été bien caractérisé en termes de leurs caractéristiques géologiques et géochimiques **(Kedaid, 2007; Saibi, 2009),** propriétés sur l'hydrogéologie, et composition physico-chimique **(Arab et *al.*, 2018).** Cependant, peu d'études ont abordé l'analyse microbienne de ces sources chaudes **(Amarouche-Yala et *al.*, 2015; Bouanane-Darenfed et *al.*, 2011; Kecha et *al.*, 2007).**

Ces sources géothermiques d'Algérie ont été connues depuis l'Empire romain. Ils se situent principalement dans L'Algérie orientale et sont habitées par des organismes thermophiles. Une étude a été réalisés dans ces sources comprennent les cyanobactéries formant des tapis et des concrétions, les isolats ont été collectés à partir d'eau, de concrétions et de nattes dans neuf sources chaudes avec des températures de l'eau allant de 39 à 93°C.Dix-neuf morphotypes *cyanobactériens* différents ont été identifiés, dont les plus abondantes étaient trois espèces de *Leptolyngbya*, accompagné de membres des genres *Gloeocapsa, Gloeocapsopsis, Stigonema, Fischerella, Synechocystis, Microcoleus, Cyanobacterium, Chroococcus et Geitlerinema.* Les analyses de diversité moléculaire étaient en bon accord général avec l'identification classique et a permis la détection d'espèces supplémentaires dans trois sources avec des températures supérieures à 50°C. Ils correspondaient à un clade de *Synechococcuset* à des parents de l'intracellulaire calcifiant *Candidatus Gloeomargaritalithophora***.** Les sources les plus chaudes étaient dominées par des membres de *Leptolyngbya*, cyanobactéries de type *Synechococcus et Gloeomargarita*, tandis que les *Oscillatoriales* autres que *Leptolyngbya, Les Chroococcales et les Stigonematales* dominaient les températures inférieures **(Amarouche-Yala et *al.*, 2014).**

Une autre étude visait à la production et la caractérisation partielle d'un xylanase thermostable d'une nouvelle bactérie anaérobie thermophile *Caldicoprobacter algeriensis* souche TH7C1 T isolée d'une source chaude de Hammam D'bagh (Guelma) (70°C) située au nord-est de l'Algérie **(Bouacem et *al.*, 2014).**Une autre bactérie anaérobie thermophile a été isolée de cette source hydrothermale qui la source le plus chaud de pays, avec des températures pouvant atteindre 98°C. Cette bactéries appartient aux *Firmicutes*, commande les *Clostridiales* et présente traits phénotypiques, génétiques et phylogénétiques importants avec son plus proche parent *Caldicoprobacter oshimaifamille* des *Caldicoprobacteraceae* à proposer comme roman espèces de ce genre, les échantillons de cette étude ont été prélevés à une altitude de 320 m dans la zone aquifère était proche de la surface**(Bouanane-Darenfed et *al.*, 2011).**Dans la même source chaude de Debagh, une étude rapporte la première tentative de décrire les communautés de bacilles aérobies. Parmi lesquels 41 bacilles aérobies, thermophiles et halotolérants ont été isolés et sélectionnés sur la base de tests morphologiques, physiologiques et biochimiques. L'analyse de la séquence d'ADNr 16S a révélé que le les isolats récupérés appartenaient à quatre genres bactériens dominés par le genre Bacillus représenté avec les espèces *B. mojavensis, B. licheniformis, B. subtilis, B. atrophaeus, B.amyloliquifaciens et B.pimulus.* Le genre *Aeribacillus* représenté par l'espèce *A.*

*pallidus**,** le genre Geobacillusreprésenté* par l'espèce *G. toebii*, et le genre *Hydrogenophilus* représenté par l'espèce *H. hirschii*. Bien que l'analyse MALDI-TOF ait déterminé que les isolats appartenaient au genre *Bacillus* qui contenait *B. licheniformis, B. mojavensis, B. subtilis, B. atrophaeus et B. pumilus* **(Arab et *al*, 2018).**

Des échantillons d'eau et de sédiments prélevés à Hammam Ouled Ali et Hammam Debagh, deux sources chaudes, plage de températures et une composition minérale très riche, situées dans la région de Guelma, au nord-est de l'Algérie**,** les isolats de l'eau et des sédiments ont été caractérisés par des méthodes phénotypiques et moléculaires ont indiqué que trois familles dominaient les deux sources chaudes: Planococcaceae, Bacillaceae et Paenibacillaceae,une analyse basée sur les séquences d'ARNr 16S a révélé que ces souches étaient affiliées aux genres *Anoxybacillus, Bacillus, Brevibacillus et Geobacillus* répartis entre les deux zones chaudes ressorts **(Gomri et *al*, 2018).**

II.5.2-Dans d'autre pays

Des souches bactériennes thermophiles ont été isolées avec succès de différentes sources chaudes en Arabie Saoudite, ont été obtenues à partir de trois sources chaudes: Al-Majardah, Al-Khubah et Al-Ardah. Ces sources chaude sont une plage de température de 50 à 70°C, et ont donc une grande chance de soutenir la survie des bactéries thermophiles **(Rehman et Shash, 2011).**

L'identification moléculaire et l'analyse phylogénique des isolats prometteurs sélectionnés a confirmé l'identité des isolats comme *Bacillus aerius, Bacillus licheniformis* et *Bacillus sonorensis*, qui ont le potentiel de produire les enzymes cibles α-amylase, protéase et lipase, respectivement **(Alrumman et *al.*, 2018).**

Des sources chaudes jordaniennes étaient situées dans différentes villes et représentent un thermophile modéré à thermophile (39,9–6°C), y compris Hammamet Ma'in, Zara Dead Sea, Hammamat Afra, Al-Burbita et Al-Hemma**,** ontété choisie pour collecter l'échantillon pour l'isolement des bactéries thermophiles. Le séquençage du L'ADNr 16S des isolats suivi d'une recherche BLAST a révélé que neuf souches pouvaient être identifiées comme *Bacillus licheniformis* et une isoler sous le nom de *Thermomonas hydrothermalis*. Il s'agit du premier rapport sur l'isolement des espèces de *Thermomonas* des sources chaudes jordaniennes **(Mohammad et *al.*, 2017).**

Prenant un autre exemple au Maroc dont la diversité des bactéries thermophiles a été étudié dans quatre sources chaudes : Ain Allah (45°C), Abaynou (39°C), Moulay Yaacoub

(57°C) et Ain Jerri (39°C). Deux cent quarante (240) bactéries thermophiles ont été récupérées, identifiée set caractérisé. Tous les isolats étaient Gram positifs, en forme de bâtonnet, formant des spores et halotolérants. En se basant sur BOXA1R-PCR et le séquençage du gène de l'ARNr 16S, les isolats récupérés étaient dominés parle genre *Bacillus* (97,5%) représenté par *B. licheniformis, B. aerius, B.sonorensis, B. subtilis (subsp. Spizizeniiet subsp. Inaquosurum), B. amyloliquefaciens (subsp. Amyloliquefacienset subsp. plantarum), B. tequilensis, B. pumiluset Bacillus sp*. Seuls six isolats appartenaient au genre *Aeribacillus* représenté par *A. pallidus etAeribacillus sp*. Dans cette étude, *B. aerius et B. tequilensis* sont décrits pour la première fois comme bactéries thermophiles **(Aanniz et *al.*, 2015).**

Des souches bactériennes thermophiles distinctes ont été isolées de la source chaude de Soldhar dans la région de Garhwal, en Inde Himalaya, des échantillons d'eau et de sol ont été prélevés, les isolats ont grandi au cours d'une large gamme de températures (20–100°C) et de pH (5–10).Deux isolats ont été sélectionnés pour le gène d'ARNr 16S analyse de séquence, et a montré une similitude maximale et homologie la plus proche avec *Geobacillus thermocatenulatus* et *Geobacillus thermoleovorans*, respectivement, ce qui indiquant que les isolats de deux différents des échantillons (sol et eau) sont membres du genre *Geobacillus.* Auparavant, une bactérie hautement thermostable *Geobacillus stearothermophilus* a été isoléedu même site de source chaude **(Arya et *al.*, 2015).**

Dans la montagne des Andes, la plus longue chaîne de montagnes continentale du monde, situé en Amérique du Sud, plusieurs sources thermales sont associées à des activités géothermiques et volcaniques, Sept sources thermales situées au centre et à l'est des chaînes de ces montagnes ont été étudiées pour l'isolement des bactéries thermophiles anaérobies produisant de l'hydrolyse enzymes.

Cette étude démontré que ces sources thermales contenaient diverses populations microbiennes de thermophiles anaérobies comprenant différents groupes métaboliques de bactéries, y compris des souches appartenant aux genres *Thermoanaerobacter, Caloramator, Anoxybacillus, Caloranaerobacter, Desulfomicrobium, Geotoga, Hydrogenophilus, Desulfacinum et Thermoanaerobacterium* avec des amylases, les protéases, lipases, estérases, xylanases et pectinases ; par conséquent, les souches représentent une source prometteuse d'enzymes à potentiel biotechnologique **(Rubiano-Labrador et *al.*, 2019).**

II.6 Application des thermophiles

Les extrêmophiles et spécialement les thermophiles, représentent une nouvelle frontière pour la biotechnologie. Les travaux de recherche sur ces organismes sont pour une grande part motivés par les applications biotechnologiques. Deux types d'applications différentes peuvent être distingués. Le premier repose sur l'utilisation directe des organismes et le second sur leur biomolécules. Ce sont les enzymes, mais aussi les protéines, les lipides, les osmolytes (thermolytes) et une grande diversité de métabolites secondaires. L'ensemble constitué des cellules, des ressources génétiques et des biomolécules est regroupé sous le terme général d'actifs biotechnologiques **(Quérellou et Guézennec, 2010). (Figure 6)**

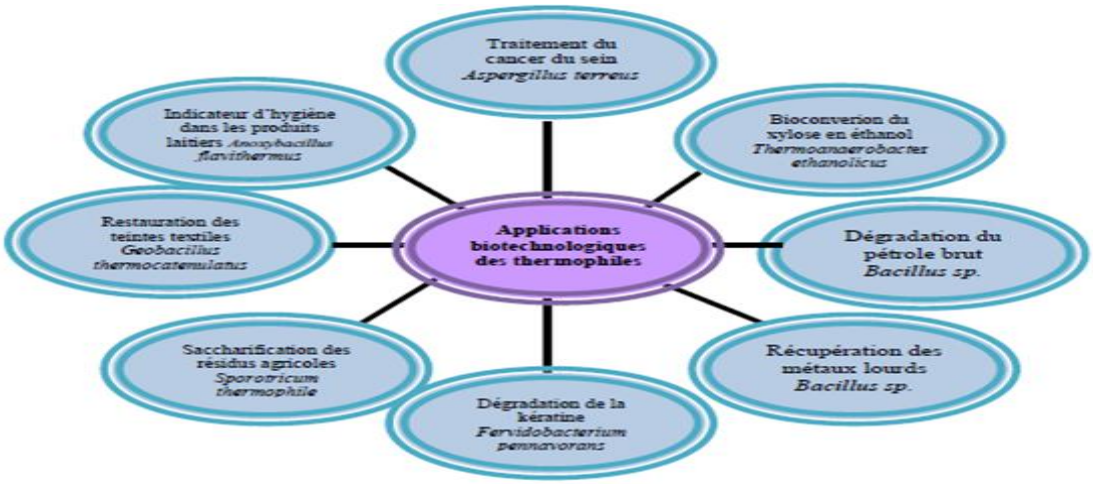


Figure 6 : Différentes applications de micro-organismes thermophiles **(Mehta et al., 2016).**

II.6.1 Applications basées sur les cellules entières:

Il s'agit d'applications pour lesquelles l'utilisation de biomolécules purifiées à partir des cultures est non rentable ou d'applications qui requièrent l'action directe d'une population microbienne, voire d'un mélange complexe de différentes espèces.

Parmi les applications des thermophiles

II.6.1.1 -Agents de minéralisation :

Dans les traitements industriels de minéraux, des microorganismes oxydant le soufre et le fer sont employés pour libérer l'or inclus dans les minéraux sulfurés et dans la Concentration des métaux lorsque les procédés chimiques conventionnels ne sont pas

rentables. L'espèce *Pyrobaculum furiosus* est capable de désulfuriser le caoutchouc en donnant un produit avec de bonnes propriétés mécaniques **(Bredberg et *al.*, 2001).**

II.6.1.2 - Piles à combustible microbiennes :

Les thermophiles constituent un gisement très largement inexploré dans ce domaine. Une étude réalisée a démontré qu'une communauté microbienne thermophile isolée de sédiments marins était capable de produire un courant électrique dans une pile à combustible fonctionnant à 60°C en utilisant de l'acétate comme carburant **(Mathis et *al.*, 2008).**

II.6.1.3 -Production d'hydrogène :

La recherche sur la production biologique d'hydrogène est devenue attrayante pour des utilisations possibles du bio hydrogène comme source d'énergie propre. La voie de production du bio hydrogène dépend de l'approvisionnement en substrats organiques et pourrait idéalement être adaptée à une production d'énergie accouplée avec un traitement des déchets organiques **(Antranikian, 2008).**

II.6.2 Applications basées sur les biomolécules :

La plupart des applications des extrêmophiles sont basées sur l'utilisation de leurs biomolécules. La plus connue est la PCR ou amplification génique in vitro qui repose sur les propriétés des ADN polymérases thermost Applications basées sur les biomolécules :

La plupart des applications des extrêmophiles sont basées sur l'utilisation de leurs biomolécules. La plus connue est la PCR ou amplification génique in vitro qui repose sur les propriétés des ADN polymérases thermostables. **(Querellou et Guzennec, 2010).**

II.6.2.1 -Enzymes :

Les enzymes et les composés organiques des thermophiles sont convoités pour divers procédés se déroulant à haute température et intéressant des domaines aussi variés que la chimie, la pharmacie, l'agro-alimentaire, ou encore la biologie moléculaire. Les enzymes issus des microorganismes des sources hydrothermales présentent un potentiel important en raison de leur thermostabilité. Les enzymes de thermophiles ont déjà trouvé ou pourraient trouver des applications dans le blanchiment du papier, la conversion de l'amidon en dérivés sucrés, la dégradation de composés protéiques résistants, l'industrie textile ou le travail de laboratoire sur l'ADN **(Alain et *al.*, 2010)**

Chapitre III :

Les Thermoenzymes

III.1 Les thermoenzymes :

Les enzymes thermostables « themoenzymes » sont des macromolécules issues de micro- organismes thermophiles de nature protéique caractérisées par leur activité catalytique qui gouverne des réactions biochimiques spécifiques **(Alain, 2003).** Grâce à leurs caractéristiques physico-chimiques qui en font des outils particulièrement intéressants pour de nombreuses applications, les thermo-enzymes sont souvent plus stables, faciles à utiliser, elles permettent, d'une part, de réduire le nombre d'étapes dans certains procédés industriels, d'augmenter la productivité, et d'autre part d'accéder à des nouveaux domaines d'applications du fait de leurs résistances vis-à-vis de la température **(Haki et Rakshit, 2003).** Les principaux facteurs qui contribuent à la stabilité des enzymes thermophiles sont: l'augmentation du pairage ionique, l'augmentation des interactions hydrophobes (p.ex. à l'interface des sous-unités), une diminution du ratio surface/volume (« packing efficiency »), l'augmentation du nombre de ponts disulfures et hydrogènes, une diminution des contraintes conformationnelles et une stabilité des boucles **(Hupé, 2008).** Les enzymes thermostables arrivent au premier rang des molécules d'intérêt biotechnologique.

III.2 Les différents enzymes :

III.2.1 Les amylases :

Les amylases (EC.3.2.1.x) sont des saccharidases qui hydrolysent les liaisons osidiques . Elles participent notamment à la dégradation de l'amidon pour donner des sucres disaccharidiques et des petits polymères composés d'unités de glucose. On a deux types d'amylases : les a - amylases (EC 3.2.1.1) et les ß - amylases (FC 3.2.1.2) **(Gupta et *al.*,2003) .**

La température optimale des c - amylases est souvent proche de la température de croissance du microorganisme producteur (**Vihinen et Mantsiila , 1989)** . Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie actuelle. Elles ont presque totalement remplacé l'hydrolyse chimique de l'amidon **(Pandey et *al*., 2000 ; Burhan et *al*., 2003)** . Les amylases ont une gamme étendue d'applications dans beaucoup de champs tels que les industries de la saccharification d'amidon, de textile , des aliments , de boulangerie , de brassage et de distillation **(Gupta et *al* ., 2003)** . En raison de l'importance industrielle de ces enzymes , un intérêt est porté a l'isolement de nouvelles amylases appropriées , à applications industrielles nouvelles **(Burhan et *al*., 2003)**

III.2.2 Les cellulases :

Les cellulases (EC 3.2.1.4) se distinguent des autres glycosides hydrolases par leur capacité à hydrolyser les liaisons B-osidiques entre les résidus glycosyliques **(Lynd et *al.*, 2002).** Elles sont principalement utilisées dans l'industrie textile pour le bioblanchiment des tissus, aussi bien que dans les détergents de blanchisserie pour ramollir les fissus **(Aygan et Arikan, 2008).** Les cellulases sont aussi utilisées dans la production du bioéthanol å partir de biomasse cellulosique (**Wang et *al.*, 2009**). En combinaison avec les xylanases, amylases et pectinases, les cellulases contribuent à la clarification et à la siabilite des jus de fruit en augmentant les taux d'extraction et de filtration **(Bhat, 2000)**

III.2.3 Les glucose-isomérases :

Elles assurent la conversion du glucose en mélange équilibre de glucose et fructose. Cette conversion constitue l'application la plus importante des enzymes immobilisées dans divers industries**.(Brown et *al*. 1993)** ont pu isoler cette enzyme à partir de Thermotoga maritima qui est thermostable à 120°C pendant 10 minutes en présence de cations divalents (Ca, Mg), La glucose isomérase de *Streptomyces sp*. présente une activité optimale à 95°C, et elle est complètement stable à 80°C pendant 5 heures et 30 min, avec une demi vie de 5 heures à 90°C **(Borgi et *al.*, 2004).** En **2012, Mu et *al.*,** ont pu cloner et exprimer le gène de *Acidothermus cellulolyticus* (activité maximale à 80 C et à pll 6,5 en présence de Ca" et Mg) dans Escherichia coli. **Liu et *al.*, (2015)** ont pu clone et exprimer la glucose isomérase de *thermoanaerobacter ethanolicus* dans Escherichia coli BL 21

III.2.4 Les chitinases

La chitine est l'élément structural principal de la plupart des mycètes et de quelques invertébrés (Antranikian et al., 2005) C'est un homopolymère linéaire de N-acétyl-D-glucosamine à liaison a (1-4) Dans les environnements marins, la chitine est produite en grande quantités et sa conversion est assurée par des enzymes chitinolytiques qui sont des chitines endo-hydrolases (Chitinases A: EC 3.2.1.14), des oligomères exo-hydrolases (Chitinases B: EC 3.2.1.52) et la N-acétyle-D-glycosaminidase (Chitobiase: EC 3,21.30). Les enzymes chitinolytiques sont employées pour une large action sur plusieurs substrats et dérivés chitineux **(Antranikian, 2008).** La présence d'enzymes chitinolytaques a été observée chez les archées et les bactéries **(Gao et *al.*, 2003; Andronopoulou et Vorgias, 2004, Tanaka et *al.*, 2004)**. Les gènes codant ces enzymes ont été isolés, clonés et caracterisés Plusieurs espèces mcrobiennes sont a l'origine de la synthèse de chitinases: *Thermococcus*

chitinophagus (Andronopoulou et Vorgias, 2004), *Colletotrichum gloeosporioides* Cg-10 (Souza et al, 2005) et *Bacillus licheniformis* **(Wang et *al.*, 2010**). Une thermoactive chitinase de l'archée *Sulfolobus rokedaii* a éte purifiée et caractérisée. Elle a présenté une activité optimale à 70°C et à pll 2.5 **(Staifenberger et *al.*, 2012).** Zhang et A (2015) ont pu caractériser des *chitinases* à partir de la souche fongique *Thermomyces lanuginosus SSBP*. Ces chitinases nommées Chitl et Chit2 présentent respectivement des activités optimales à 50 et 40'C et à pli 5 et 4. Recemment, le gene codant une chitinase isole de *Paenibacillus* barengoltzii CAU904 a été cloné et exprimé dans *Escherichia coli*. L'enzyme recombinante. nommée PbChi 70, présente une masse moléculatre de 70 kDa et une activité optimale à 55'C et à pll 5,5 **(Yang et *al.*, 2016)**

III.2.5 Les pectinases

Les pectinases constituent un groupe unique d'enzymes qui catalysent la dégradation de polymères pectiques présents dans les parois des cellules végétales. Elles jouent un rôle dans la clarification et la piunilication des jus de truit afin d'augmenter le rendement de jus, de réduire sa viscosité, d'ëčlairçit sa couleur et de macèrer les tissus des fruits et des légumes et dans le prétraitement des eaux usées **(Kashyap et *al.*, 2000; Fenghour et *al*., 2002, Pedrolli et *al*, 2009).** Les pectinases peuvent aussi être utilisées en agroalimentaire, dans les judustries du papier, dans la fermentation du the et-café instantané **(Jayani et *al.*, 2005).** Les souches les plus productrices ont slé, idencifiees comme membres des genres: *Paenibacillus, Bacillus, Streptomyces ete*-**(Kashayp et *al*, 2001; Li et *al*, 2012b: Arijit et *al*., 2013: Giacobbe et *al.*, 2014).**

III.2.6 Les pullulanases

Elles agissent spécifiquement sur les liaisons a (1-6) et elles sont généralement utilisées en combinaison avec des a-glucosidases et a ou B amylases pour l'hydrolyse de l'amidon dans certaines producties **(Larreta-Garde, 2011).** Brown et al. (1990) ont été les premiers à isoler une pullulanase du genre *Pyrococcus furiosus*, sa température optimale est de 100 ° C à pH 5,5.

Brown et kelly (1993) ont isolé une autre pullulanase de *Thermococcus litoralis* et constaté que sa thermostabilité augmente en prêsence de calcium. L'enzyme de *Fervidobacterium pennavorans* Ven5, isolée d'une source thermale au Nord d'Italie, a présenté une activité optimale à 85°C et à pH 6 **(Koch et *al.*, 1997).** L'espèce *Rhodothermus*

marinus IT1990 a montré une activité pullulanique maximale à une température 80°C et à un pH 6,5-7 et une demi-vie de 3 heures et 30 min à 85°C **(Gomes et *al*., 2003).**

III.2.7 Enzymes de l'ADN :

Les ADN polymérases thermostables jouent un rôle fondamental dans les techniques d'ingénierie du vivant grâce à leur aptitude à amplifier un gène donné à des millions de copies au moyen de la réaction de PCR **(Querellou et Guzennec, 2010).** La Taq polymérase isolée d'une bactérie thermophile *Thermus aquaticus* est régulièrement utilisée pour la réaction d'amplification de l'ADN, c'est la clé de la PCR grâce à sa thermostabilité, elle est capable de supporter les nombreux cycles de montée en température atteignant 94 °C **(Gregoire et al., 2009).**

III.2.8 Enzymes de dégradation et de modification des polysaccharides :

L'α-amylase est bon représentant des enzymes hydrolytiques thermostables, constitue un modèle intéressant pour l'étude des bases structurales de la thermostabilité des protéines. Parmi les bactéries, Bacillus sp est largement utilisé pour la production d'α-amylase thermostable afin de répondre aux besoins industriels. *Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus, Bacillus licheniformis* et *Bacillus amyloliquefaciens* sont de bons producteurs d'α-amylase thermostable, et elles ont été largement utilisées pour la production commerciale de l'enzyme pour diverses applications **(Prakash et Jaiswal, 2010).**

III.2.9 Protéases :

Les protéases des thermophiles présentent un intérêt accru en raison de leurs applications variées dans les industries agro-alimentaires, textiles biomédicales, pharmaceutiques, et dans la gestion des déchets en tannerie. Parmi les bactéries, *Bacillus sp* a été une source majeure de protéases thermostables **(Sinha et Khare, 2013).** Dans l'industrie des détergents, la sérine protéase de KP43 présente une activité maximale entre les pH 6 et 12 et les températures de 45 à 65 °C **(Querellou et Guzennec, 2010).**

III.2.10 Lipases :

Les lipases thermostables sont parmi les enzymes les plus utilisées dans le traitement du domaine de la chimie organique et des applications de la biotechnologie. Ils ont le potentiel d'être utilisées dans le traitement des huiles et des graisses, et dans l'industrie des détergents **(Mukhtar et *al.*, 2018).** La majorité des lipases actuellement disponibles sont

dérivées à partir des mésophiles et agissent dans une large gamme de pH mais sont instables à des températures plus élevées (généralement supérieures à 70 °C). Un grand nombre de lipases thermostables ont été isolées à partir de thermophiles. Certaines lipases thermostables ont été isolées de thermophiles modérés, notamment des représentants du genre *Bacillus (Bacillus thermoleovorans, Bacillus sp, Bacillus stearothermophilus*) **(Sharma et *al.*, 2013).**

III.3 Applications biotechnologiques des enzymes protéolytiques :

Le marché mondiał des enzymes est en nette progression essentiellement du fait de l'intérėt que porte ces dernières à l'environnement et aux industries dites propres. Les protéases alcalines bactériennes trouvent de nombreuses applications dans divers secteurs industriels **(Rao et *al.*, 1998; Gupta et *al.*, 2002).** Ce type d'enzymes est utilisé essentiellement dans les détergents pour les lessives, les tanneries pour le traitement de cuir, l'industrie pharmaceutique pour la synthèse peptidique, le traitement des rejets, dans le traitement de la soie et dans l'industrie alimentaire.

III.3.1 Détergence :

Actuellement, les protéases utilisées dans les détergents à lessive représentent 25% des ventes mondiales totales des enzymes. Selon Freedonia Group **(www.FreedoniaGroup .com),** la demande en enzyme protéases sera 1,8 milliard de dollars en 2017. L'utilisation de ces enzymes dans les produits détergents est la clef du probléme écologique résultant de l'utilisation excessive des détergents chimiques lesquels sont corosifs, toxiques et non biodėgradables entraînant ainsı la polhution de l'environnement **(Kumar et *al.*, 1998, Kumar et Takagi, 1999).** Les enzymes détergentes peuvent être utilisées sous forme de poudre, granules ou liquide. Bien que leur incorporation sous forme liquide soit pratique, les enzymes granulées se sont avérées les plus stables au cours du stockage dans les formulations dėtergentes solides et liquides **(Ghani, 2001).** Différents types d'enzymes permettent, d'obtenir un haut niveau de performance en terme d'élimination des taches. le nettoyage total. la protection du textile, garantir la blancheur du linge, préserver l'éclat des couleurs et lutter contre la redeposition de la salete. Citons certaines enzymes commerciales: Alcalase Savinase" EverlaseM Lspérase. KannaseTM **(Banik et Prakash, 2004, Mukherjee, 2007)**

III.3.2 Tannerie et traitement du cuir :

Conventionnellement, la chaux et beaucoup de sulfures sont utilisés pour le tannage du cuir. Les effluents ainsi créés comptent pour 50-60% de la charge polluante due aux tanneries

(Sivasubramanian et *al.*, 2008). L'utilisation des enzymes en tannerie, comme alternative des produits chimiques, a été un succès dans la réduction de la polfution de l'environnement, la diminution des coûts et amélioration de qualité du produit final qui devient plus résistant à la déchirure et présentant une teinte plus uniforme **(Tang et *al.*, 2004).** Les enzymes protéolytiques sont employées dans les trois étapes du traitement du cuir. trempage, épilage et confitage. Elles permettent de retirer les poils et la chair du cuir sans dénaturer le collagène. Cette étape est cntique pour la production d'un cuir de qualité. Il a été rapporté que des protéases de certaines bactéries de nature alcalophiles étaient performantes pour l'épilage des peaux d'animaux **(Nilegaonkar et *al.*, 2007).** Plusieurs microorganismes produisent des kératinases qui peuvent entre utilisées lors de l'étape d'épilage: *Bacillus subtilis* **S14 (Macedo et *al.*, 2005),** B, subtilis KD-N2 **(Cai ct *al.* 2008),** *Bacillus halodurans* PPKS-2 **(Prakash et *al.*, 2010)**, *Trichoderma harzianum* MH-20 **(Ismail et *al.*, 2012),** *4spergillus nidulans* (Nashy et Ahmady 2012) et *Paenibaciflus woosongensis* TKB2 **(Paul et *al*,. 2014).**

III.3.3 Récupération de l'argent :

Les protéases alcalines sont aussi employées dans les bioprocédés utilisant les films de rayons X usagés pour la récupération de l'argent En effet, ces pellicules contiennent approximativement 1,5 à 2% (m/m) d'argent dans leurs couches de gélatine. La pratique conventionnellè de récupération de l'argent consiste à bailer les films ce qui provoque des problèmes de pollution environnementale. Pour cela l'utifisation des enzymes hydrolytiques permet de recycler non seulement l'argent mais aussi la base de polyester du film. La protéase alcaline de *Bacillus coagulans PB-77* a décompose le revêtenient gélatineux des films de rayons X usagés à partir desquels f'argent a ete, récuperé **(Gajju et *al*,. 1996).** Une autre protéase alcaline de B. subtilis permet la décomposition de la couche de gélatine et la récupération de l'argent à la suite d'une incubation à 50-60°C pendant 30 min **(Joshi et Satyanarayana, 2013).**

III.3.4 Industrie pharmaceutique :

Diverses protéases sont utilisées pour la production d'agents à usage thérapeutique. En effet, l'administration orale des protéases Luzyme et Nortase" produites par Aspergillus oryzae aide à la digestion chez certains individus souffrant de déficits en enzymes lytiques. De même, la collagénase de *Clostridium* est utilisée en combinaison avec un large spectre d'antibiotiques dans le traitement des brûlures et des blessures **(Atsumi et Ueha, 1983).** L'utilisation des protéases alcalines, ayant une activité fibrinolytique, dans le traitement des

thromboses a été également rapporté **(Kim et *al.*, 1996).** Une élastotérase provenant de B subtitis peut être utilisée pour le traitement de turoncles, d'abcès et de plaies profondes **(Kudrya et Simonenko, 1994)**. Des enzymes protéolytiques telles que la subtilisine, la collagénase, la kératinase, l'élastase..etc, ont été utilisées pour l'élimination de cérumen (Gupta et al, 2013). L'activité élastase de certains microorganismes a été exploitéc pour la préparation d'élastotérase qui est utilisée dans le traitement des brülures de plaies inicetées **(Suzuki et *al,* 2005**). Les kératinases ont montré leur aptitude dans le traitement de l'acne. E lles élimunent les cellules mortes et la kératine **(Spyros, 2003; Selvam et Vishnupriya. 2012)**

III.3.5 Traitement des eaux usées et des rejets industrielles :

Les protéases solubilisent les-ordures de nature protéique et contribuent à la diminution de la demande biologique en oxygène (DBO) dans fes systèmes aquatiques, c'est pourquoi, les protéases alcalines ont été utilisées dans la gestion des ordures de diverses industries et activitès ménagères. Des protéases et notamment des kératinases -sont utilisées pour traiter les eaux usées riches en kératine provenant des chaînes d'abattage de volailles **(Anbu et *al.*, 2004; Moreira-Gasparin et *al* 2009, Jain et Jain, 2010)** et elles sont utilisées aussi comme agents dépilatoires pour éliminer les restes de cheveux et le nettoyage des drains sanitaires responsables de l'émission d'odeurs nauséabondes **(Forgacs et *al.*, 2011).**

III.3.6 Traitement de la soie :

Les fibres de séricines représentent 25% de la soie brute, elles sont éliminées par immersion des fibres dans l'eau chaude savonneuse et légèrement alcaline **(Prasong et *al.*, 2009)**. Ce processus étant généralement coûteux, une méthode alternative suggérant l'utilisation des préparations enzymatiques, telles que les protéases, a été mis au point. Le traitement enzymatique consiste à placer les fibres dans une solution contenant l'Alcalase" de Novozymes à pH 8 et à une température de ordre de 55 à 60°C **(Smith et *al.*, 1966; Guang et Phillips, 2009, Mandal et Kundu, 2010).** D'autres enzymes telles que la papaïne, trysine, pepsine, savinase peuvent être utilisée pour remplacer la procédure classique de traitement de la soie **(More et *al.*, 2013, Sumana et *al.*, 2013)**

III.3.7 Industrie alimentaire :

Les protéases animales ont été fréquemment employées dans la fabrication du fromage, la préparation des hydrolysats de soja et l'attendrissage de la viande **(Rao et *al.*,**

1998). Une catalase alcaline **(Takagi et *al.*, 1992)** et une protéase alcaline thermostable (Wilson et al., 1992) ont montré leurs efficacités à attendrir la viande puisqu'elles possèdent la capacité d'hydrolyser les tissus connectifs ainsi que les fibres protéiques des muscles. Les protéases ont été aussi utilisées dans la préparation d'hydrolysats de protéines à haute valeur nutritionnelle. Ces hydrolysats de protéines jouent un rôle important dans la régulation de la pression artérielle et sont employés dans les formulations des aliments pour les nourrissons, dans les produits diététiques et pour l'enrichissement des jus de fruits et des boissons non alcoolisées **(Neklyudov et *al.*, 2000).**

III.3.8 Synthèse de peptides :

Bien que les protéases soient des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse. Certaines études ont montré la possibilité d'utiliser la protéase alcaline pour catalyser la synthèse de peptides en milieu organique Cette réaction de synthèse consiste en une suite de réactions (formation d'un lien amide) entre différents acides aminés pour obtenir une molécule plus complexe, un peptide, en utilisant d'enzymes qui sont actives dans les solvants organiques à faible quantité d'eau avec une bonne solubilité du substrat et du produit. De plus, plusieurs travaux ont été réalisés pour synthétiser des peptides par des enzymes immobilisées sur des supports insolubles **(Gololobov et *al.*, 1994; Ben Elhoul et *al.*, 2015; Toplak et *al.*, 2015).**

Partie Expérimentale

Matériel et Méthodes

Toute la partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire pédagogique de la faculté des sciences à l'université de Dr Yahia Fares Médéa pendant la période allant de janvier à mai 2021

I .Materiel

I.1. Verrerie

Erlenmeyer, Bécher, Flacons en verre, Tubes à essai, Pipette pasteur, Lame/ Lamelle.

I.2. Appareillage

Aggitateur, Vortex, Balance, Densitométre, Thermométre, PH-métre, Bec bunsen, Autoclaves, Etuve, Distillateur, Bain marie, Incubateur, Congélateur/ Refrigirateur, Microscope optique. **(ANNEXE 8)**

I.3. Milieux culture

TTM, T162M, TM162M, gélose à l'amidon, gélose CMC, gélose à la pectine, gélose Tween 20, gélose tween 80, gélosé à base de lait écremé, gélose au jaune d'œuf, bouillon nutritif, gélose TSI. **(ANNEXE 1)**

I.4. Autres produits consommables

Lugol, fushin, violet de gentiane, alcool, rouge congo, kovax, nitrate 1 et 2, VP 1 et 2, l'indole, zinc, L'eau distillé, glycérol, l'eau physiologie,

I.5. Autres matériel :

Entonnoir, Eprouvette graduée, Spatule, Bareau magnitique, anse à platine, Ependorf, embout, Pissette, Micropipette, Boites de pétri.

II. Méthode

II.1 Objectif

- ✓ Isolement et identification phynotypique des souches thermophiles à partir des sources hydrothermales
- ✓ Evaluation de l'activité enzymatique des souches préalablement isolée sur les milieux (gélose à l'amidon, gélose CMC, gélose à la pectine, gélose Tween 20, gélose tween 80, gélosé à base de lait écremé, gélose au jaune d'œuf)

II .2 période et site de prélèvement

Les échantillons d'eaux et de sédiments ont été prélevés entre janvier et Avril 2021 à partir de 3 points, répartis entre les sources thermales de Hammam Essalihine de MEDEA, Hammam k'sana de BOUIRA et Hammam Righa de AIN DEFFLA . Le choix des échantillons à traiter est réalisé de façon à varier la nature et le lieu de prélèvement de ces derniers.

II.2.1. -Source thermale de MEDEA (Hammam Essalihine)

Ce hammam est l'un des plus importants Hammmams thermaux de la wilaya de Médéa. Se trouvant à 6 km de Berrouaghia et à 30 km du chef-lieu de wilaya (Médéa), il s'alimente en eaux thermales à partir de cinq sources, à raison d'un débit de 3 litres à la seconde. La chaleur de ses eaux naturelles atteint la température de 41°, à la sortie de la source. La composition chimique des eaux de Hammam Essalihine est d'un intérêt thérapeutique certain, notamment pour les maladies de la peau, les maladies respiratoires ainsi que le traitement du foi et de l'estomac. Avec cette particularité, Hammam Essalihine est un atout considérable que détient le secteur du tourisme thérapeutique dans la wilaya de Médéa. **Figure (7)**



Figure 7: localisation site d'étude: Hammam Essalihine-MEDEA sur la carte géographique.

.

II.2.2. -Source thermale de BOUIRA (Hammam K'sana)

La station thermale de Hammam K'sana, sise à l'est de la commune d'El Hachimia, à 20 km au sud de la wilaya de Bouira et dans le prolongement ouest de la chaîne marno-calcaire des Bibans. Sa minéralisation est essentiellement sulfurée sodique à faible teneur en gaz sulfureux. Son débit est de 8 litres/seconde et sa température de 64° C.

La source thermale de Hammam Ksana fait l'objet de nombreux témoignages sur ses vertus thérapeutiques et sa fréquentation depuis les temps les plus reculés. **Figure (8)**



Figure 8 : localisation de site d'étude: Hammam K'sana -BOUIRA sur la carte géographique.

La richesse et la haute température de ces sources permanente sont des conditions physico-chimiques seraient favorables à la prolifération de types variés de microorganismes thermophiles.

II.2.3. -Source thermale de AIN DEFLA(Hammam Righa)

Hammam Righa est situé à 100 km au Sud-Ouest d'Alger dans la wilaya de Ain Defla à une altitude de 525 mètres. Il se trouve dans une région verdoyante et boisée appréciée pour ses qualités climatiques.

Hammam Righa jouit d'une position géographique exceptionnelle, en effet, située dans une région montagneuse et boisée, à l'abri des vents et des grands froids, un lieu particulièrement indiqué pour la reconstitution de l'équilibre psychosomatique **Figure (9).**



Figure 9: localisation de site d'étude: Hammam Righa- AIN DEFLA sur la carte géographique

Les eaux de cette station thermale, dont la température varie suivant les sources de 44°C (111,20°F)à 68°C (154,40°F), sont des eaux salines, sulfatées calciques, très favorables dans le traitement des rhumatismes, des séquelles de traumatismes, l'anémie et toutes les maladies relatives à l'appauvrissement du sang.

II.3 Méthode de prélèvement

Les échantillons d'eaux sont prélevés à 10-20 cm de la surface dans des flacons en verre stériles de 250ml. Les flacons sont remplis jusqu'au bord et sont ouverts et bouches sous l'eau afin d'éviter la formation des bulles d'air, et sont aussi remplis en prenant soin de ne pas toucher l'intérieur du flacon, du bouchon et le filetage. Ceux des sédiments sont récupérés depuis le fond de la source, à l'aide d'une spatule stérile ,les prélèvements ainsi recueillir dans des boites en plastiques stériles et boucher à des conditions aseptiques. Puis emballés dans du papier d'aluminium stérile. **(Rainey et Oren, 2006).**

Des mesures de la température est réalisée respectivement à l'aide d'un thermomètre à immersion totale avec mercure **(Tableau 02).**

Tableau 2: Les températures et la nature des prélèvements issus des trois sites hydrothermales.

. Sites	Hammam.Essalhine de MEDEA.	Hammam Righa de AIN DEFLA .	Hammam K'sana de BOUIRA
Type de prélèvement	**Eau + Sédiments**	**Eau seulement**	**Eau + Sédiments**
Température	45 C°	56 C°	64 C°

II.4. Acheminement des prélèvements

Tous les prélèvements sont transportés dans une glacière à une température comprise entre 4 et 6 C°.

II.5 Analyse des prélèvements

II.5.1. Enrichissement, préparation des dilutions et ensemencement

L'enrichissement, la préparation des dilutions et l'ensemencement ont été effectué dans un délai ne dépassant pas les 12 heures après le prélèvement .

II.5.1.1. Préparation des dilutions et ensemencement à J0

- **Eau**

1ml d'échantillon d'eau est inoculé dans 9 ml d'eau physiologie **(Annexe 2)** stérile à 9% homogénéisation de la solution est effectuée pendant quelques minutes à l'aide d'un agitateur vortex.

- **les sédiments**

1 g de l'échantillon est dissout dans 10 ml d'eau physiologie stérile homogénéisation de la suspension est effectuée pendant quelques minutes à l'aide d'un vortex.

A partir des solutions mères des deux types d'échantillon (eau et sédiment), une série des dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-4} sont préparés dans de l'eau physiologique stérile.

Pour l'isolement des bactéries thermophiles 100 µl de chaque solution mère et de chaque dilution de deux échantillons (eau et sédiment) sont ensemencés par strie à la surface des

boites de pétri contentent les 3 milieux gélosé qui sont le milieu TTM, le milieu T162M et le milieu MT162M à l'aide des pipettes pasteur stériles. Les boites sont incubées à 60 °C pendant une semaine.

II.5.1.2. Enrichissement, préparation des dilutions et ensemencement

A J0, 10 ml d'eau et 1g de sédiment sont placé séparément dans 100ml de bouillon simple (B.S) et incubé une semaine à 60°C avec agitation. Les cultures positives sont traduites par l'apparition des troubles.

Aprés une semaine d'incubation, les bouillons d'enrichissement on subi les mêmes étapes de préparations de dilutions et d'ensemencement décrit précédemment (**II.5.1.1).**

II.5.2. Isolement, identification et conservation des isolats

II.5.2.1. Purification des isolats

Les colonies obtenues sur les différents milieux utilisés ont fait l'objet de plusieurs repiquages sur les mêmes milieux d'isolements jusqu'à purification

II.5.2.2. Identification phénotypique des isolats

Une série d'études macroscopique, microscopique et biochimique a été réalisée pour l'ensemble des souches isolées en aérobiose.

A/ Examen macroscopique

L'examen macroscopique des colonies bactériennes a été réalisé directement à l'œil nu, il permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

les éléments d'identification macroscopiques sont: La forme des colonies (rondes, irrégulières,…etc), La taille des colonies par la mesure du diamètre ,la couleur de la colonie, L'élévation (convexe, concave, plate), L'opacité (opaque, translucide ou transparente) ,La surface (lisse, rugueuse, sèche, dentelée,…etc) **(Thomas et *al.*, 1970)**

B/ Examen microscopique après coloration de Gram

Elle doit son nom au bactériologiste danois **Hans Christian Gram** qui met au point le protocole en 1884. Les bactéries présentent toutes une paroi constituée d'une substance, la muréine qui est un peptidoglycane. Celle-ci est recouverte par une membrane externe

chez les bactéries Gram-, tandis que les bactéries à Gram+ en sont dépourvues. Cette paroi de part son organisation permet de les classer soit dans les Gram+ ou les Gram-.

La morphologie, l'arrangement cellulaire et le Gram des isolats sont déterminés sur des cultures de 24 heures par la technique de coloration différentielle décrite par **Gram (1884)** à l'aide d'un microscope photonique.

• La première étape de la coloration consiste à réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune (sur un milieu solide) et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine (ou à la pipette stérile) puis on étale sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame.

• La seconde étape nécessite le séchage et la fixation par la chaleur (pour tuer les bactéries, fixer leur structure cytologique, et les faire adhérer à la lame).

• La troisième étape de coloration nécessite l'ajout de quelques gouttes de violet de gentiane sur le frottis préalablement fixé pendant une minute, après rinçage, on ajoute le Lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) pendant une minute, puis on rince et on ajoute quelques goutes d'alcool 90° (ne va traverser que la paroi de certaines bactéries « les Gram – », et décolorer leur cytoplasme) pendant 30 seconds. Puis on rince avec de l'eau distillée, En fin, quelques gouttes de fuchsine de Ziehl sont versées sur la lame qu'on laisse agir une minute (étape sert à colorer les bactéries (Gram-) qui se sont décolorées lors du traitement précédant). La lame est lavée à l'eau distillée. Après séchage, on passe à l'observation microscopique. De ce fait, les bactéries Gram – sont colorées en rose et le Gram + en violet. **(Annexe 3)**

Lecture : les lames ont été observées à l'aide d'un microscope optique au grossissement X100

C/ Caractérisation biochimique

Pour la détermination des caractères biochimiques des différentes souches isolées, nous avons utilisé quelques tests classiques d'orientation et la galerie Api 20 E.

- **Catalase**

La catalase est une enzyme qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène ($2H_2O_2$ + Catalase → $2H_2O$ + O_2) **(Marchal et Bourdon, 1982**), constitue un bon élément de différentiation utilisé en systématique bactérienne. La technique consiste à réaliser

un frottis bactérien a partir des colonies prélevées avec soin sur gélose simple, sur lequel on dépose quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène. La présence de catalase se matérialise par une production de bulles instantanément. **(Annexe 4)**

- **Oxydase**

Ce test permet de mettre en évidence la présence du cytochrome oxydase, une enzyme catalysent une réaction d'oxydoréduction. Cette enzyme est capable d'oxyder le réactif N diméthyle paraphenylene diamine en derivéviolet. la technique est consiste à déposer sur un carré d'oxydase la colonie a tester et laisser agir. après quelques secondes observer l'apparition ou pas de la couleur violette.(la coloration violette traduit la présence de l'oxydase) **(Singleton, 2005 ; Joffin et Leyral, 2006). (Annexe 5)**

- **Nitrate réductase**

La nitrate réductase est capable de catalyser la réaction de réduction de nitrates (NO3-) en nitrites (NO2-) et chez certains bactéries en azote (N2) . la technique consiste à réalise rune culture dans un bouillon nitraté. incuber à 60°C pendant 24-48h , ajouter au moment de la lecture quelques gouttes des réactifs de (nitrate 1 et 2) , le virage immédiat de la couleur du jaune en rouge nous indique que la souche est NR+ , Si le milieu reste inchangé (jaune) on ajout alors de la poudre de Zinc, s'il devient rouge le test est négatif , et s'il reste jaune on dit donc que la souche est NR+ puisqu'elle a réduit le nitrate directement en azote $\mathbf{N_2}$.

- **TSI**

La Triple Suger Iron. Agar contient trois glucides (glucose, lactose et saccharose). La fermentation de ces glucides provoque une production d'acide, qui est détectée par l'indicateur au rouge de phénol. Des changements de couleurs en résultent, et le milieu vire au jaune en cas de production d'acide, ou au rouge en cas d'alcalinisation **(Singleton, 2005).**

- **La galerie Api 20 E:**

La galerie API 20E est un système standardisé se basant sur des tests biochimiques qui mettent en évidence les métabolismes bactériens. Elles sont utilisées en diagnostic in vitro pour la classification, la détermination et l'identification bactérienne des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif.(**GUIRAUD, 2003**). **(Annexe 6)**

La galerie API 20E compote 20 micro tubes contenant des substrats sous forme déshydratée, Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les

milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanées ou révélés par l'addition de réactifs (kovax , VP1, VP2 et l'indole). **[De Vos et *al*., 2009].**

on a utilisé la galerie api 20 E à cause de la non disponibilité des galeries 50 CHB spécifiques aux thermophiles comportant 50 micro tubes renfermant essentiellement les sucres.

II.5.2.3. Conservation des isolats

Les souches pures identifiées ont été conservées sur des tubes Eppendorff.

- **Long terme**

La conservation des souches a été réalisée dans des tubes Eppendorf contenant le Bouillon simple avec 20% de glycérol, ces tubes ont été incubés pendant 24h à 60°C puis conserver dans un congélateur à – 20°C.

- **Courte terme**

Par piqueur centrale sur des micro-tubes contentent la gélose simple. Ces tubes ont été incubés pendant 24h à 60°C puis stocker dans un réfrigérateur à +4°C.

II.5.3. Mise en évidence des enzymes hydrolytiques extracellulaires

Les isolats sont soumis à une recherche de différents enzymes extracellulaires.

II.5.3.1 Amylase

La recherche de l'activité enzymatique de l'amylase est déterminée par l'ensemencement des souches sur gélose à amidon L'incubation est effectuée pendant 1 à 3 jours a 60°C et la lecture se fait par inondation des boites avec une solution de lugol (Annexe 3). La présence de zones claires autour de l'ensemencement témoigne de la production d'amylases **(Gordon et *al*., 1973).**

II.5.3.2 Caseinase

L'activité protéolytique est examinée par l'ensemencement des souches sur gélose au lait. les souches testées sont incubées pendant 1 à 2 jours a 60°C. La présence d'une activité caséinolytique se manifeste par la présence d'un halo clair autour des colonies suite à l'hydrolyse de ce polymère **(Priest et *al*.,1988).**

II.5.3.3 esterase

Cette activité est recherchée par l'ensemencement des souches sur milieu à base de tween 80 et 20(annexe). Après incubation à 60°C pendant 1 à 2 jours, le développement d'un précipité (zone opaque) autour des colonies témoigne de la présence d'une lipase **(Gonzalez et *al*, 1978)**

II.5.3.4 Cellulase

Le milieu de base est supplémenté par 0,5% (p/v) de carboxyméthycellulose (CMC). Après incubation à 60°C pendant 1 à 2 jours, les boites de Pétri sont remplies d'une solution de rouge congo à 0,1% (p/v) et placées pendant 15 à 30 minutes à 55°C. La solution de rouge congo est remplacée par une solution à 1M de NaCl et les boite sont laissées pendant 5 à 10 minutes à température ambiante. La production de cellulase ou de xylanase est appréciée par l'apparition de zones claires autour des colonies **(Bragger et *al.*, 1989).**

II.5.3.5 La recherche de la Lécithinase

Ce test est réalisé par ensemencement de la souche en une seule strie sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile (egg-yolk agar ou Gélose à l'œuf). L'apparition de toute zone claire autour de la culture après 24 à 72 heures d'incubation à 60°C, témoigne que la souche possède la lécithinase **[De Vos et *al.*, 2009]. (Annexe 7)**

Résultats et discussion

II.1 Isolement et purification des isolats

Les échantillons d'eau et de sédiments des 3 points de prélèvements ont été utilisés pour l'isolement de bactéries aérobies thermophiles sur 3 différents milieux de culture solides riches en oligo éléments (TTM, T162M, TM162M). les besoins nutritifs des bactéries thermophiles sont différents de ceux des bactéries mésophiles. En effet, plusieurs auteurs ont noté un besoin particulier de vitamines, d'acides aminés mais aussi de calcium et de magnésium ou permettre la croissance des bactéries thermophiles **(Surucu, 1999).**

Après incubation des boites de Pétri à 60 °C, deux à trois colonies représentatives de la variabilité morphologique de chaque boite ont été sélectionnées et purifiées au moins deux fois sur la gélose simple thermus thermophilus agar par un repiquage en stries d'épuisement et incubées à la même température d'isolement. Le choix de ces températures d'isolement est justifié par le fait que la plupart des bactéries thermophiles aérobies hétérotrophes possèdent des températures optimales de croissance entre 50 °C et 60 °C **(De Vos, 2015)**

Un total de 64 souches ont été isolées. Le code de chaque isolat est composé de lettres et/ou de numéros (A, B, BA1, BA2, IA1, IA2, I1, I2, W1,W2,……). Ces isolats présentent des aspects microscopiques et macroscopiques différents**.** Une sélection préliminaire a été faite sur la base de ces différences macroscopiques et microscopiques (coloration de Gram) pour choisir quelques souches qui ont fait l'objet d'une identification biochimiques par des tests biochimiques d'orientation (catalase, oxydase,…) et par galeries miniaturisées API 20E.

II.1.1 Caractérisation phénotypique des souches isolées des trois sites

64 souches d'aspects différents ont été isolées à partir des prélèvements d'eau et de sédiments prélevés des trois sites, ces souches ont subi une série de test macroscopiques, microscopiques et biochimiques. Les résultats de cette caractérisation sont présentés dans les tableaux suivants. **Tableaux (03/04/05)**

II.1.1.1 Observation macroscopique :

La figure (10) illustre l'aspect macroscopique de quelques souches isolées de l'eau thermale de Hammam Essalhine. L'aspect des colonies bactériennes a été déterminé selon les critères de base décrits par **Harley et Prescott (2002)**

Les colonies acquises sont généralement rondes ou ovale, grande ou petite, lisses, bombé, jaune ou blanche. **Figure (10) Tableau (03)**

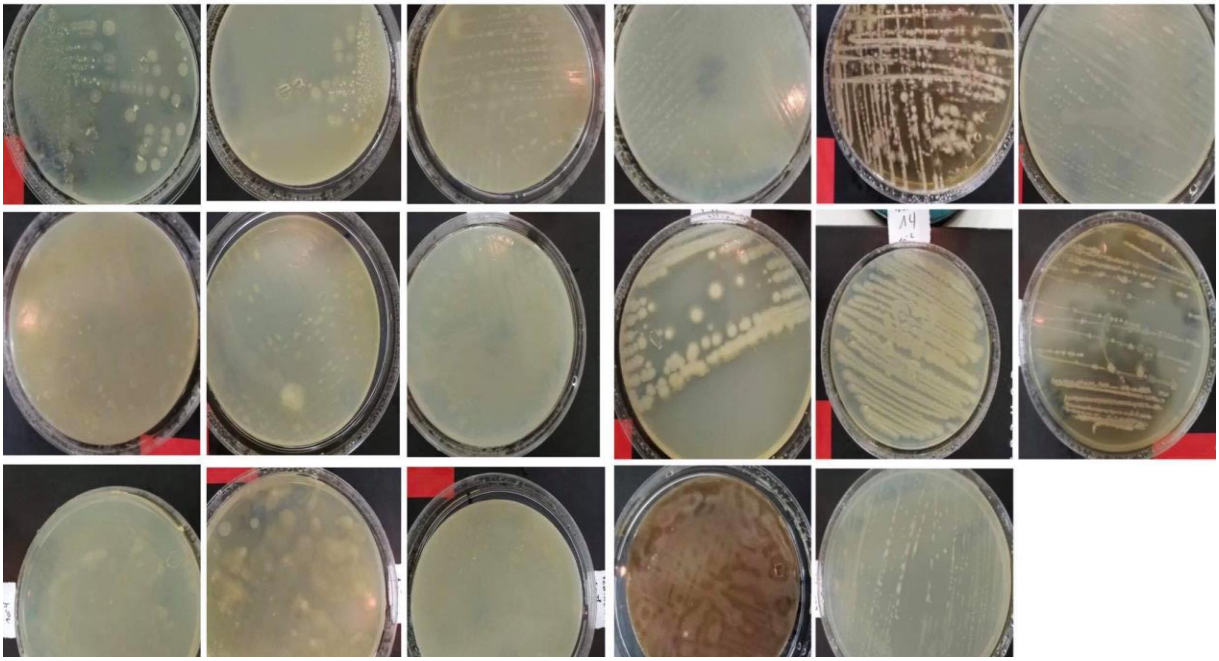


Figure 10: cultures des différentes souches sur GS
(BA1 ;BA2 ;BA3 ;BA4 ;BA5 ;BA6 ;BA7 ;BA8 ;BA9 ;BA10 ;BA11 ;BA12 ;BA13 ;BA14 ;BA15 ;BA16B ;A17)

Tableau 3 : Caractérisations culturale et cellulaire des isolats (H.Essalhine).

SOUCHES	Forme	Taille	Couleur	Aspect
BA1	Ronde	Petite	Blanche	Bombé
BA2	Ronde	Petite	Blanche	Bombé
BA3	Ovale	Petite	Blanche	Lisse
BA4	Ovale	Petite	Jaune	Lisse
BA5	Ronde	Petite	Jaune	Bombé
BA6	Ronde	Petite	Blanche	Lisse
BA7	Ronde	Grande	Blanche	Lisse
BA8	Ronde	Petite	Blanche	Lisse
BA9	Ronde	Grande	Jaune	Bombé
BA10	Ovale	Petite	Blanche	Lisse
BA11	Ovale	Petite	Jaune	Bombé
BA12	Ovale	Petite	Blanche	Bombé
BA13	Ronde	Grande	Blanche	Bombé
BA14	Ovale	Grande	Jaune	Bombé
BA15	Ronde	Petite	Blanche	Lisse
BA16	Ovale	Grande	Blanche	Lisse
BA17	Ovale	Petite	Blanche	Lisse

La figure (11) illustre l'aspect macroscopique de quelques souches isolées de l'eau thermale de hammam Righa , la description morphologique des colonies et des cellules bactériennes des souches bactériennes sélectionnées est rapporté dans le tableau (10). les colonies obtenues

sont généralement ronds avec une pigmentation beige , jaune et orange , blanche , transparente, crème. la plupart des souches sont lisses .

L'aspect des colonies bactériennes a été déterminé selon les critères de base décrits par **Harley et Prescott (2002) Figure (11) (Tableau 04).**

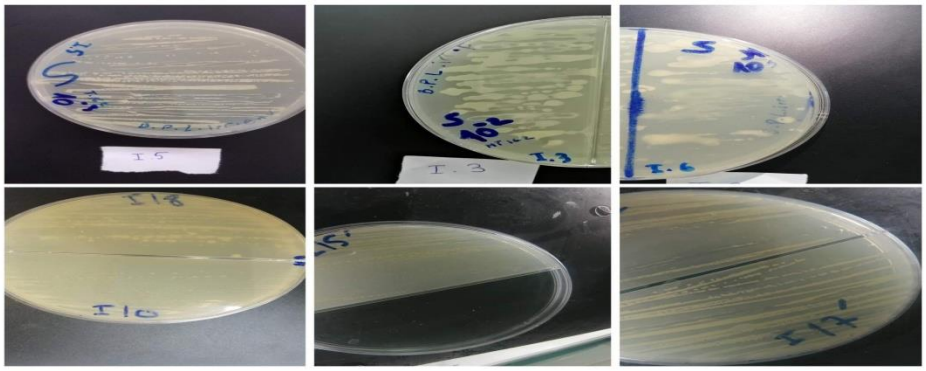


Figure 11: aspects macroscopiques des souches sélectionnées (I3, I5, I6, I10, I15', I17', I18)

Tableau 4: l'aspect macroscopique des isolats(H.Righa).

Souches	**Forme**	**Taille**	**Couleur**	**Aspect**
iA 1	Ronde	Petite	Beige	Lisse
iA 2	Ronde	Petite	transparante	Lisse
iA 3	Envahissante	Grande	blanchâtre	Lisse bombé
iA4	Ronde	Petite	Jaune claire	Lisse
iA 5	Ronde	Petite	Crème	Lisse
iA 6	Ronde	Grande	blanchâtre	Lisse plate
i 10	Ronde	Moyenne	orange	Lisse
i 15'	Ronde	Petite	orange	Bombé lisse
i 15	Ronde	Petite	créme	Lisse
i 17'	Envahissante	Grande	créme	Plate
i 18	Envahissante	Grande	jaune	Plate

La figure (12) illustre l'aspect macroscopique de quelques souches isolées de l'eau thermale de hammam K'sana , la description morphologique des colonies et des cellules bactériennes des souches bactériennes sélectionnées est rapportée dans le tableau (14). Les colonies obtenues sont généralement ronds avec une pigmentation beige, jaune, blanche, transparente, crème. la plupart des souches sont lisses **Figure (12) Tableau (05).**

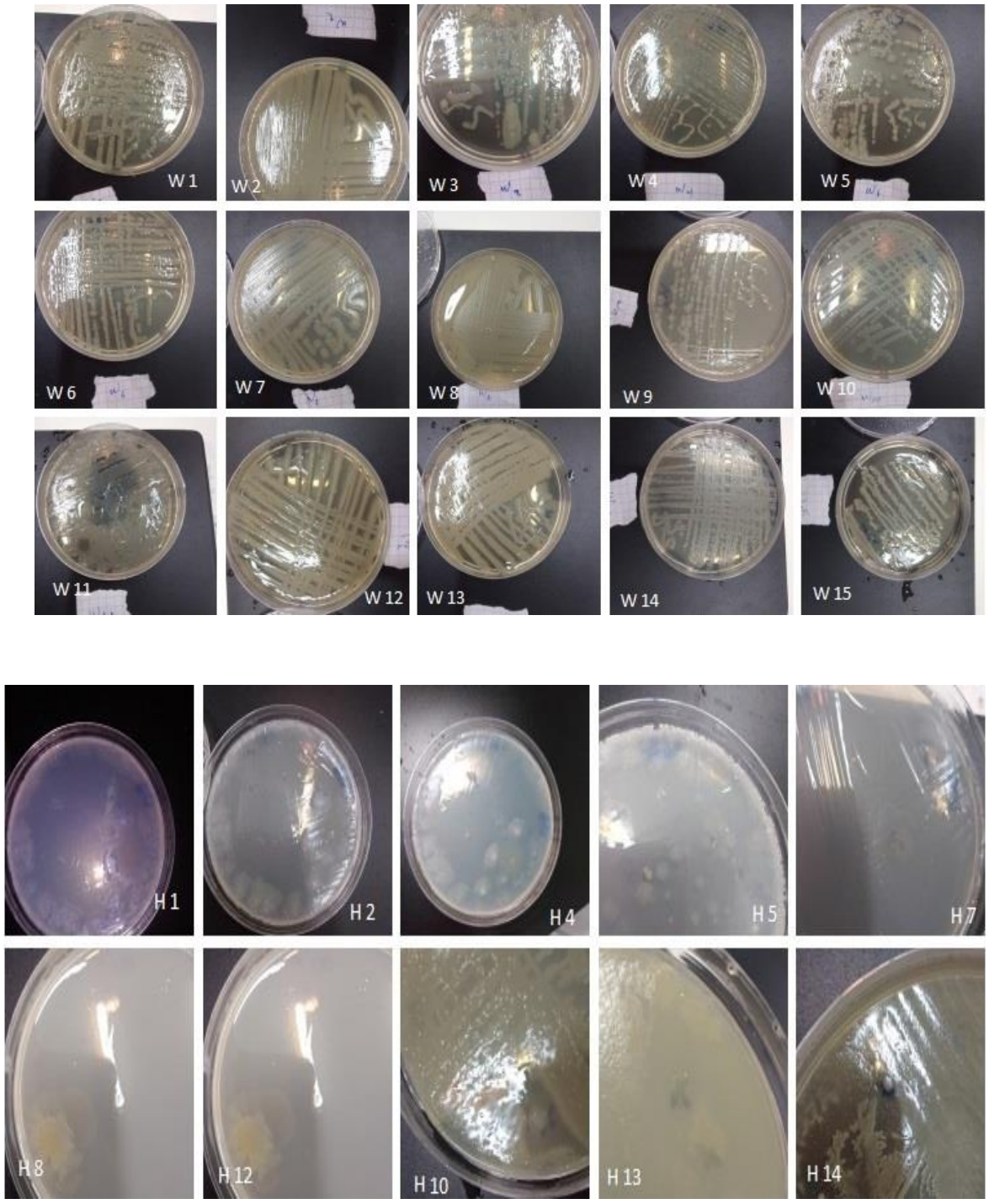


Figure 12: Aspects macroscopique des souches sélectionnées. **(W1 - w15) (H1, H2, H4, H5, H7, H8, H10, H12, H13, H14)**

Tableau 5 : l'aspect macroscopique des isolats (H.K'sana).

Souches	Forme	Taille	Couleur	Aspect
W1	Ronde irrégulier	Grande	Jaune fleurissante	Rugueuse
W2	Huileux	Grande	Blanchâtre flou	Lisse
W3	Ronde Irrégulier envahissante	Moyenne	Jaune claire	Lisse plate
W4	Irrégulier	Petite	Blanchâtre	Lisse
W5	Ronde irrégulier	Petite	Blanchâtre flou centre blanc foncé	Rugueuse
W6	Ronde régulier	Petite	Blanchâtre	Lisse plate
W7	Ronde avec centre bombée	Grande	Blanchâtre	Lisse
W8	Ronde régulier	Petite	Transparente	Lisse
W9	Ronde bombée	Petite	Jaune	Lisse
W10	Pointée	Petite	Jaune	Pointée
W11	Irrégulier envahissante	Grande	Blanchâtre	Lisse plate
W12	Irrégulier huileux	Moyenne	Blanchâtre	Lisse plate
W13	Irrégulier	Moyenne	Jaune	Lisse
W14	Pointée	Petite	Jaune	Rugueuse
W15	Pointée, Hémolyse de gélose	Petite	Jaune Crémé	Rugueuse
H1	Ronde Irrégulier	Grande	Blanchâtre	Lisse
H2	Ronde Régulier	Petite	Blanchâtre	Lisse
H3	Irrégulier bombée	Grande	Jaune	Lisse
H4	Ronde bordure régulier	Moyenne	Colonie transparente, centre jaune	Rugueuse
H5	Ronde	Petite	Blanchâtre	Lisse
H6	Irrégulier	Grande	Jaune	Rugueuse

H7	Irrégulier	Grande	Jaune	Rugueuse
H8	Ronde, irrégulier envahissante	Moyenne	Jaune	Lisse
H9	Pointée, hémolyse de gélose	Petite	Blanchâtre	Lisse
H10	Ronde régulier	Petite	Transparente	Lisse
H11	Irrégulier	Moyenne	Jaune claire	Rugueuse
H12	Régulier	Petite	Blanchâtre	Lisse
H13	Irrégulier	Grande	Jaune flou	Rugueuse
H14	Irrégulier	Petite	Jaune	Lisse
H15	Ronde avec un centre régulier	Moyenne	Blanchâtre centre transparent	Lisse

En étudiant la nature des échantillons à l'origine de ces isolats, il s'avère que la plupart des souches proviennent des sédiments. Dans des travaux s'intéressant à la diversité microbienne des sources géothermales, il a été constaté que l'abondance des communautés microbiennes au niveau des dépôts de sédiments est souvent plus élevée que celle de l'eau. Plusieurs facteurs influenceraient cette différence.

notamment l'importance du gradient existant entre les températures et les pH des eaux et des sédiments des sources thermales. Le temps de résidence des eaux au niveau des bassins géothermaux a une conséquence directe sur les taux de minéralisation et de carbone des sédiments et donc sur leur biodiversité **(Jiang et *al.*, 2006a; Dodsworth et *al.*, 2011; Hou et *al.*, 2013 ; KamburaHou et *al.*, 2016)**

II.1.1.2 Observation microscopique

L'observation microscopique des souches isolées de l'eau thermale de Hammam Essalhine a permis de déterminer quelques caractères morphologiques des cellules bactériennes après colorations différentielles de Gram **(Figure 13) Tableau (06)**

L'examen microscopique a révélé les résultats représentés dans le tableau (06). Parmi les 15 souches, neuf sont des bacilles à Gram positif et une à Gram négatif cinq ont une forme coccoïde, trois à Gram positif et deux Gram négatif.

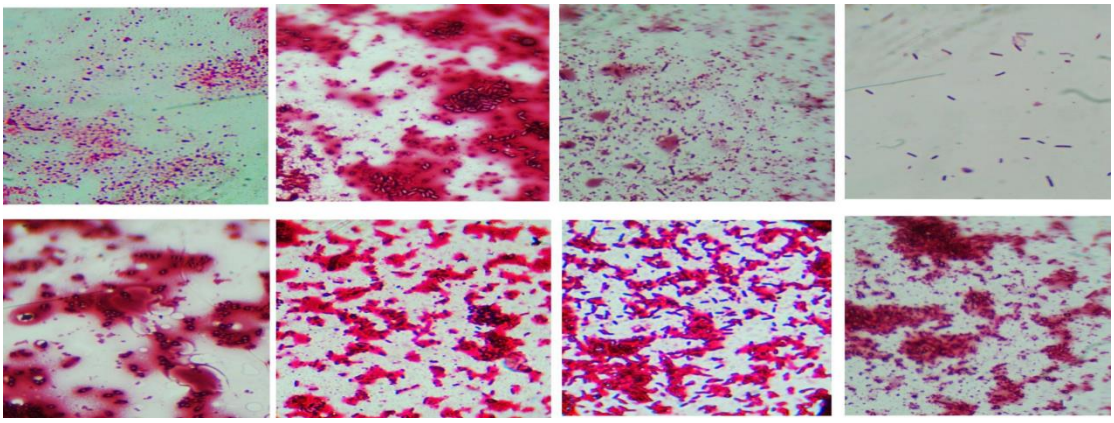


Figure 13 : Observation au microscope (x100) ; Coloration de Gram des souches **(BA5 ,BA6,BA7,BA9,BA10,BA11,BA12,BA17)**

Tableau 6: Caractérisations microscopique des isolats (H.Essalhine).

Souches	Forme	Gram	Regroupment
BA1	Bacilles	+	Isolés
BA2	Bacilles	+	Isolés
BA3	Bacilles	+	Isolés
BA4	Bacilles	+	Isolés
BA5	Cocci	+	Isolés
BA6	Bacilles	+	Isolés, en longues chaines + Sporulé
BA7	Cocci	+	Isolés, en petites chaines
BA9	Bacilles	+	Isolés, en petites chaines avec Spore terminale
BA10	Bacilles	+	Isolés, en en amas
BA11	Bacilles + Cocobacilles	+	Isolés, en petites chaines
BA12	Cocci	+	Isolés
BA14	Cocci	-	Isolés
BA15	Bacilles	+	Isolés
BA16	Cocci	-	Isolés
BA17	Bacilles	-	Isolés, en longues chaines

La plupart des bactéries isolées à partir de Hammam essalhine, étaient des bacilles Gram positif

La Figure (14) illustre l'examen microscopique des souches isolées de l'eau thermale de Hammam Righa. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau (07)** Parmi les onze

isolats, dix sont des bacilles (huit sont des Gram positif et deux sont a des gram négatif), et un isolat de forme coccoïde, Gram positif **Tableau (07)**

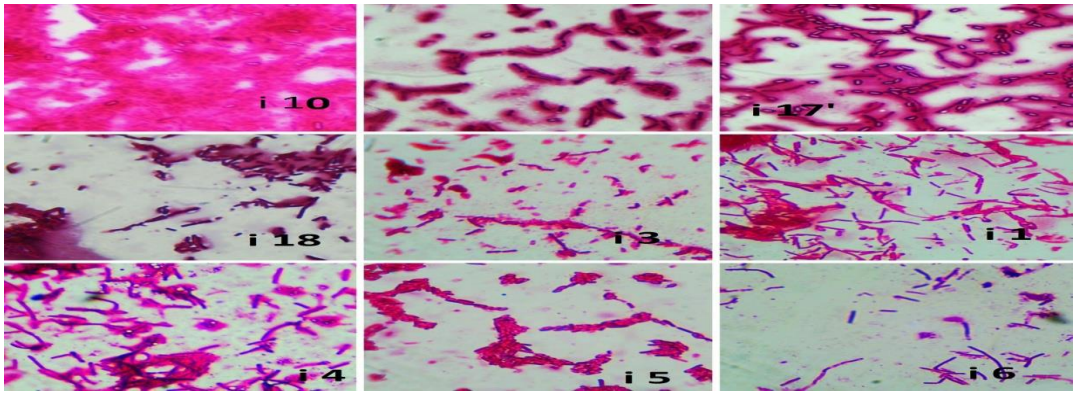


Figure 14: Observation au microscope photonique (x100). Coloration de Gram.**(I1, I3, I4, I5, I6, I10, I15', I17', I18)**

Tableau 7: caractérisation cellulaire des isolats (H.Righa).

Souche	**Forme**	**Gram**	**Regroupement**
iA 1	Longe bacille aux bout carré	+	Isolés,en longue chaine
iA 2	Bacille	+	Isolés
iA 3	Bacille	+	Isolés en paire
iA 4	Longe bacille aux bout carré	+	Isolés
iA 5	Bacille	-	En amas (en grappe)
iA 6	Longe bacille aux bout carré	+	Isolés
i 10	Bacille	-	Isolés
i 15'	Cocci	+	Diplocoque, en chainette
i 15	Bacille	+	Isolés avec spore subterminale
i 17'	Bacille	+	Isolés, Sporulé
i 18	Longe bacille aux bout carré	+	Isolés en petite chaine

La Figure (15) illustre l'examen microscopique des souches isolées de l'eau thermale de Hammam K'sana. les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau (08)**. Parmi les 30 isolats, 29 souches sont des bacilles (19 Gram positif et 10 Gram négatif), et une souche cocci à Gram poitif. **Tableau (08)**

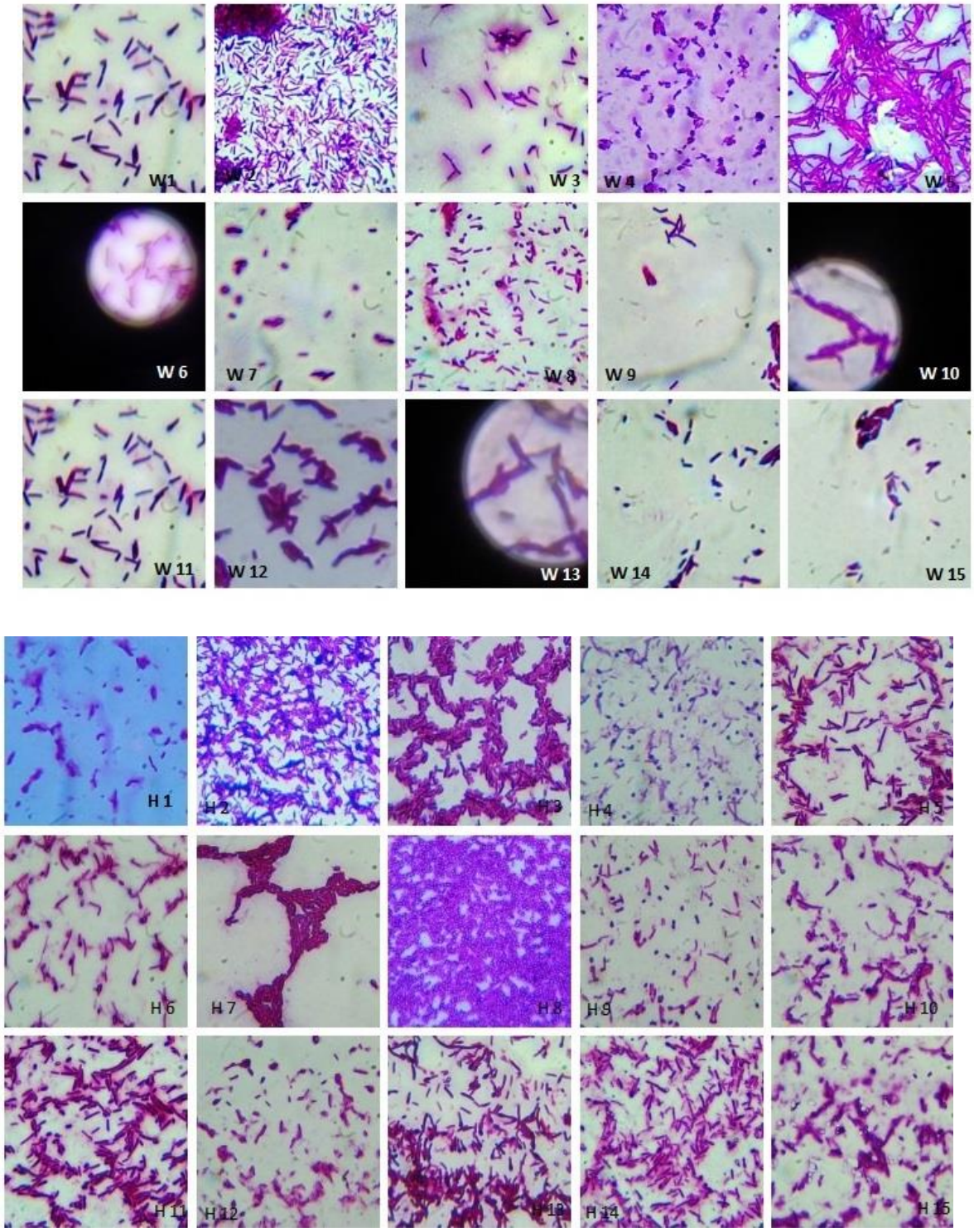


Figure 15: Aspects microscopique des souches sélectionnées (W1 – W15) (H1 – H1(Coloration de Gram x100).

Tableau 8: caractérisation cellulaire des isolats (H.K'sana).

Souches	Forme	Gram	Regroupement
W1	Bacilles	+	Isolés, en petites chaines
W2	Bacilles	+	Isolés, en chaines
W3	Bacilles	+	Isolés
W4	Bacilles	+	Isolés, en petites chaines,sporulé
W5	Bacilles	-	Isolés, en chaines
W6	Bacilles	+	Isolés, en paires
W7	Cocci	+	Isolés avec des spore
W8	Bacilles	-	Isolés
W9	Bacilles	-	Isolés, en petites chaines
W10	Bacilles	+	Isolés, en petites chaines
W11	Bacilles	+	Isolés
W12	Bacilles	+	Isolés, en petites chaines
W13	Bacilles	+	Isolés, en paires
W14	Bacilles	+	Isolés, en paires
W15	Bacilles	+	Isolés
H1	Bacilles	-	Isolés, en petites chaines
H2	Bacilles	+	Isolés, en longues chaines
H3	Bacilles	-	Isolés, en chaines
H4	Bacilles	+	Isolés
H5	Bacilles	-	Isolés, en petites chaines
H6	Bacilles	+	Isolés, en paires
H7	Bacilles	-	Isolés, en amas
H8	Bacilles	+	Isolés, en longue chaines
H9	Bacilles	+	Isolés
H10	Bacilles	+	Isolés, en petites chaines
H11	Bacilles	-	Isolés, en chaines
H12	Bacilles	-	Isolés, en paires, sporulé
H13	Bacilles	+	Isolés, en chaines
H14	Bacilles	-	Isolés, en chaines
H15	Bacilles	+	Isolés, en paires

La coloration de Gram, effectuée sur des cultures jeunes cultivées sur les différentes géloses utilisées, a révélé 41 souches à Gram positif et 15 à Gram négatif. Ces caractères morphologiques sont caractéristiques, entre autres, des bacilles aérobies de l'ordre des Bacillales **(De Vos, 2015)**

Une étude similaire a été réalisée par **AISSAT Ibtissam & MEKKI Nadjat 2018/2019**, qui ont pu isoler 10 souches bactériennes de Hammam Guergour (Nord de Sétif-Algérie) dont 9 isolats étaient des bacilles Gram positif , et un isolat de forme coccoïde, Gram négatif. Nos résultats concordent aussi avec ceux trouvés par **Gomri (2012)** qui a pu isoler 83

souches thermophiles à partir des sources thermales terrestres de l'Est Algérien, dont 59 souches étaient des bacilles Gram positif.

il est important de signaler que plusieurs isolats peuvent provenir de sites ayant des températures beaucoup plus élevées que leur température de croissance. Il est probable que ces isolats ne peuvent pas se trouver en état actif en sachant que la température est facteur important conditionnant leur prolifération.Le même raisonnement peut expliquer l'isolement de certains organismes à des températures beaucoup plus basses que leur minimum de croissance **(Niehaus et al., 1999).** Selon **Weigel (1986)**, il est également possible d'isoler des organismes thermophiles à partir de la glace arctique. Les endospores survivent aisément au transfert d'un environnement vers un autre.

La plupart des bactéries isolées des sources thermales en Algérie surtout, étaient des bacilles Gram positif. Une étude similaire a été réalisée par **LARBI (2015),** qui a isolé 59 souches bactériennes de différentes sources thermales (Hammam Debagh à Galma, Hammam bouhnifia à Mascar, Hammam Bouhjar à Temouchent, Hammam Rabi à Saida), dont 44 isolats étaient des bacilles Gram positif, mais aussi, elle a trouvé aussi des bacilles Gram négatif et des Cocci Gram positif.

II.1.1.3 Identification biochimiques des isolats

Test catalase, oxydase, N.R et TSI

Les résultats de la caractérisation biochimique des souches isolée à partir des trois sources sont représentés dans les **Tableaux (0/10/11)**

Toutes les souches isolées sont oxydase positive à l'exception des souches : BA9, BA10, BA11, iA2, iA3, iA4, iA6, w2, w3, w5,w6, w8, w9 , w10, h8, h10, h14.les souches BA3, BA5, BA10, BA16, BA17, iA3 , iA4 , iA6 , i15' , i18, w3, w15, H1, H2, H8, H12 sont catalase négative tandis que les autre souches sont catalase positive **Figure (19/20/21) (Tableau 09/10/11).**

Parmi les 15 souches analysées 8 sont positive N.R tandis que 7 souches sont négative N.R **(Tableau 10/11).**

Parmi les 4 souches analysées 3 souches contient les 3 sucres sauf H12. **Figure (21) (Tableau 11).**



Figure 16 : Test oxydase des souches (+/-)

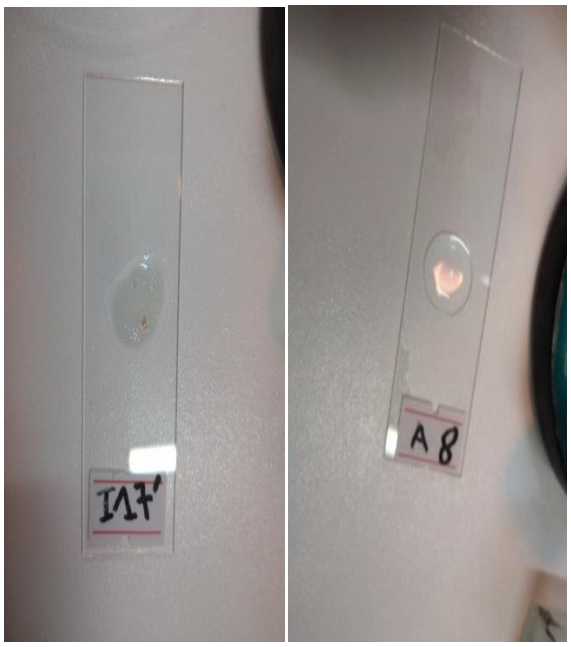


Figure 17 : Test catalase (I17' A8)

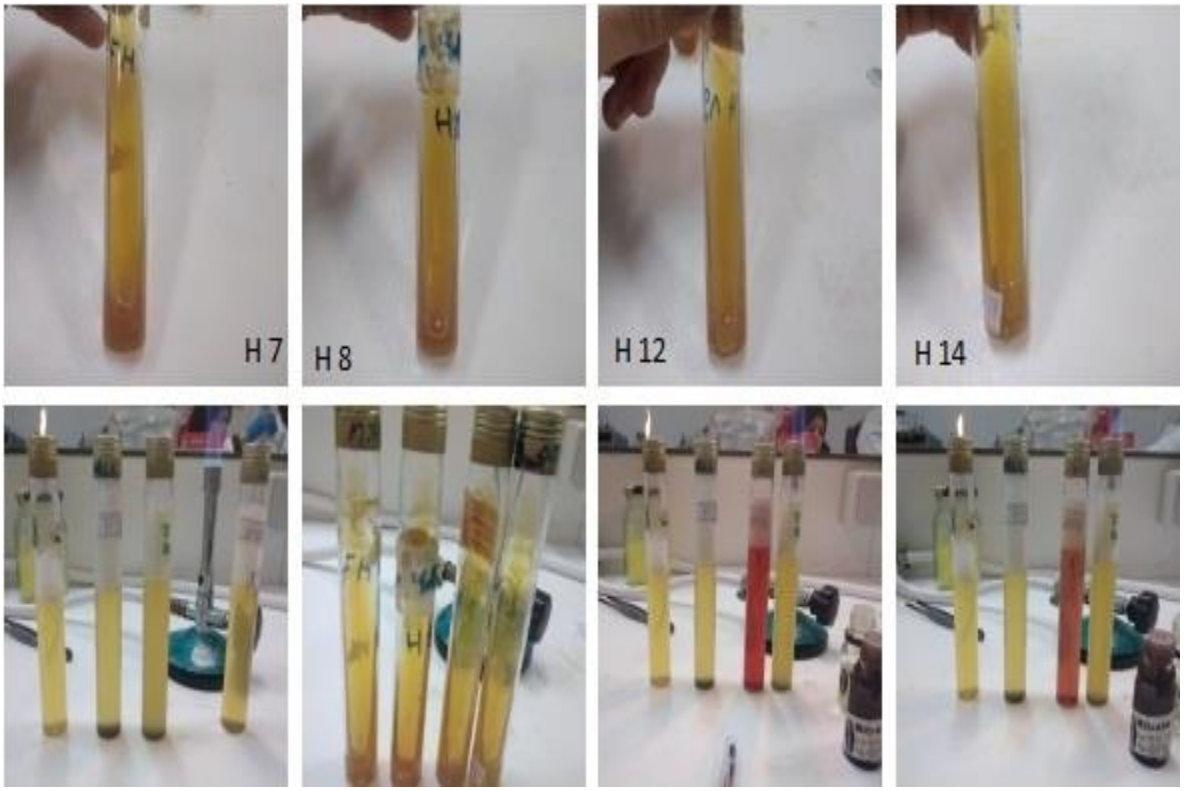


Figure 18 : Test nitrate réductase **(H7, H8, H12, H14)**

Tableau 9 :test biochimique oxydase catalase des isolats (H.Essalhine).

Souches	Test oxydase	Test catalase
BA1	+	+
BA2	+	+
BA3	+	-
BA4	+	+
BA5	+	-
BA7	+	+
BA9	-	+
BA10	-	-
BA11	-	+
BA12	+	+
BA13	+	-
BA14	+	+
BA15	+	+
BA16	+	-
BA17	+	-

Tableau 10 : caractérisation biochimique des isolats (H.Righa)

(catalase oxydase N.R).

souches	oxydase	Catalase	Nitrate réductase
iA 1	+	+	+
iA 2	-	+	-
iA 3	-	-	-
iA 4	-	-	-
iA 5	+	+	-
iA 6	-	-	+
i 10	+	+	-
i 15	+	+	+
i 15’	+	-	+
i 17’	+	+	+
i 18	+	-	-

Tableau 11 : caractérisation biochimique des isolats (H.K'sana)

(Catalase, oxydase, N.R, TSI)

Souches	Oxydase	Catalase	Nitrate réductase	TSI
W1	+	+	×	×
W2	-	+	×	×
W3	-	-	×	×
W4	+	+	×	×
W5	-	+	×	×
W6	-	+	×	×
W7	+	+	×	×
W8	-	+	×	×
W9	-	+	×	×
W10	+	+	×	×
W11	-	+	×	×
W12	+	+	×	×
W13	+	+	×	×
W14	+	+	×	×
W15	+	-	×	×
H1	+	-	×	×
H2	+	-	×	×
H3	+	+	×	×
H4	-	+	×	×
H5	+	+	×	×
H6	+	+	×	×
H7	+	+	+	3 sucres
H8	-	-	+	3 sucres
H9	+	+	×	×
H10	-	+	×	×
H11	+	+	×	×
H12	+	-	+	Glucose
H13	+	+	×	×
H14	-	+	+	3 sucres
H15	+	+	×	×

Les souches isolées lors de ce travail sont généralement oxydase et catalase positives ; c'est le cas de la plupart des isolats bactériens aérobies et anaérobies facultatives thermophiles **(Dinsdale et *al.*, 2001 ; Nazina et *al.*, 2001).**

II.1.1.4 Identification biochimique des souches par la galerie API 20 E :

Les galeries API système sont des testes miniaturisés utilisés principalement pour l'identification rapide des bactéries médicales **(Figure 19)**, néanmoins ces testes ont été largement utilisés pour la caractérisation biochimique des bactérie de l'environnement

(Logan et Berkeley, 1981 ; Busse et *al.*, 1996) . Les résultats de la caractérisation biochimique des souches sont représentés dans le **tableau (12).**

Une galerie biochimique d'identification (API 20E, bio Mérieux) a été réalisée selon le mode opératoire décrit dans le prospectus. Les galeries ont étés incubés à 37°C pendant 24h, les résultats obtenues sont les suivants :

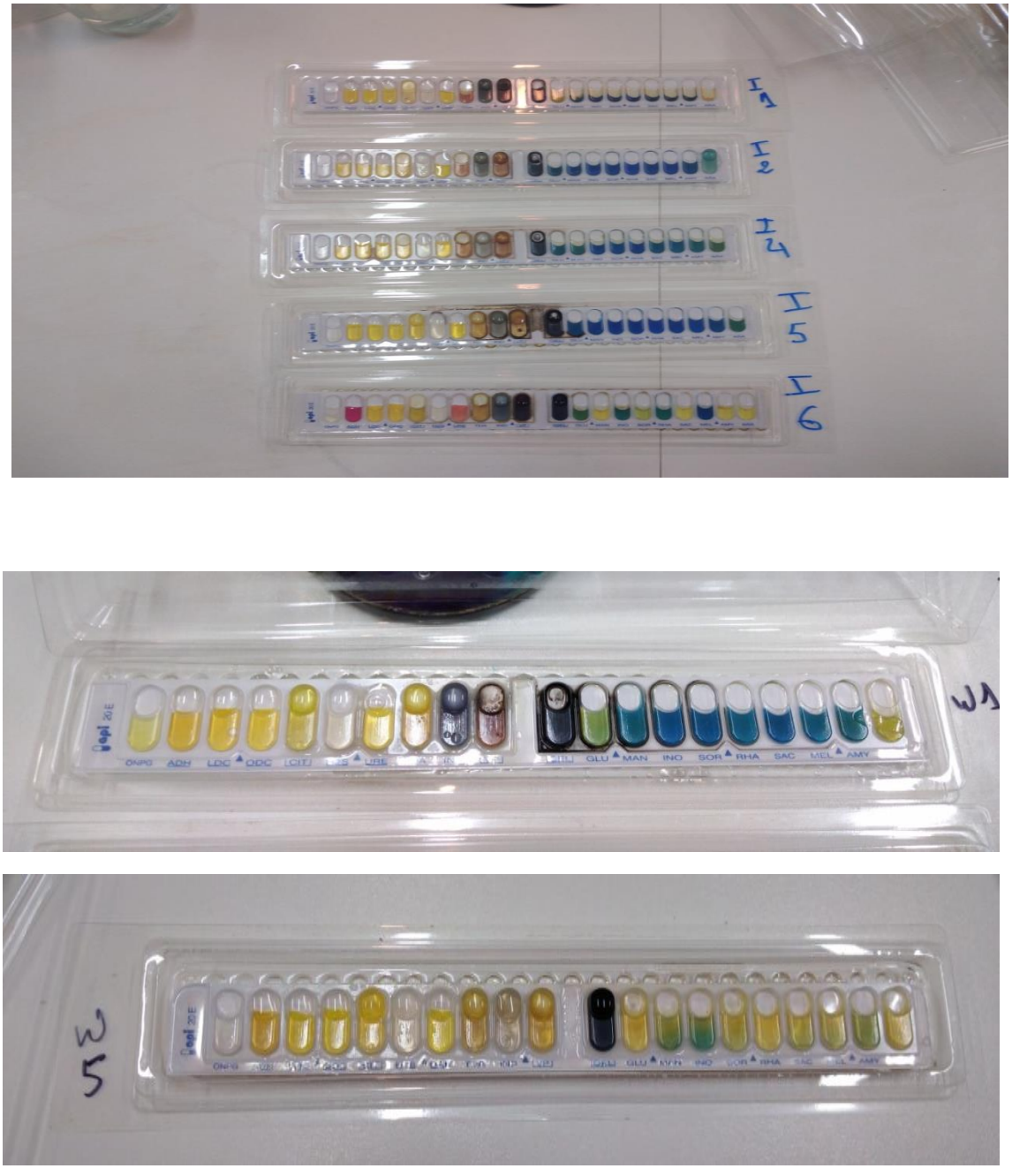


Figure 19: Galerie Api20E, appliquée sur les différentes souches **(I1, I2, I4, I5, I6, I10, I15', I17', I18 w1, w5.)**

Les résultats de la caractérisation biochimique des souches des trois sites sont représentés dans les **Tableau (12)**

Tableau 12 : résultats des 3 sites de la galerie API 20E.

Souches	**ONPG**	**ADH**	**LDC**	**ODC**	**CIT**	**H2S**	**URE**	**TDA**	**IND**	**VP**	**GEL**	**GLU**	**MAN**	**INO**	**SOR**	**RHA**	**SAC**	**MEL**	**AMY**	**ARA**
BA5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
BA9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BA11	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
BA12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
BA13	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
BA15	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
BA17	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
i 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
i 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
i 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
i 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
i 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
i 6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
i 10	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
i 15	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
i 15'	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
i 17'	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
i 18	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
W1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
W7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
W10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H7	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H8	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
H12	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
H14	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

D'après les résultats du tableau 12, on constate que les souches BA9, BA11, BA15, i6, W1, W2, W15 possèdent une B-galactosidase. Sur l'ensemble des souches, 5 souches sont Arginine dihydrolase positive, aucune souches lysine décarboxylase positives, 2 souches sont ornithine décarboxylase positive, une seule souche BA15 possède un citrate perméase

On à observé l'absence de l'uréase ainsi que l'enzyme responsable de l'hydrolyse de tryptophane en indole chez la majorité des souches. C'est un caractère fréquent chez les bactérie thermophile **(Nazina et *al*,.2001 ; Mahilrajan et *al*,.2012 ; Selim et *al*,.2014).**

D'après les resultats du tableau (08), on constate que toutes les souches BA9, BA11, i1, i2 , i3, i4, i5 , i10 , i17' , i15 , i15', W1, W2, W4, W10, W15, H7, H12, H14 ne dégradent aucun sucre tandis que les souches BA5, BA12, BA13, BA15, BA17, i6, i18, W5, W7, H8 dégradent plusieurs sucres.

La lecture des résultats de l'inoculation des galeries API 20E est procédée en se référant au Tableau de lecture de ces galeries.

Il est important de signalé que les conditions de cultures choisies ont conditionné la biodiversité obtenue et nous pouvons supposer que dans d'autres conditions, cette biodiversité aurait été encore plus grande . Les espèces identifiées ne représentent qu'une petite partie de la diversité microbienne des différents écosystèmes de la planète. On estime que seulement 1 % des micro organismes est accessibles par des techniques culturales standard reposées sur l'isolement de souches **(Ammam et *al.*, 1995).** L'essor de la biologie moléculaire peut permettre le développement des connaissances liées à cette diversité.

Les résultats des tests biochimiques obtenus suite à l'inoculation de galerie API 20 E ont été remplis dans la grille des résultats d'un programme d'identification online– **ABIS- (Figure 20).**

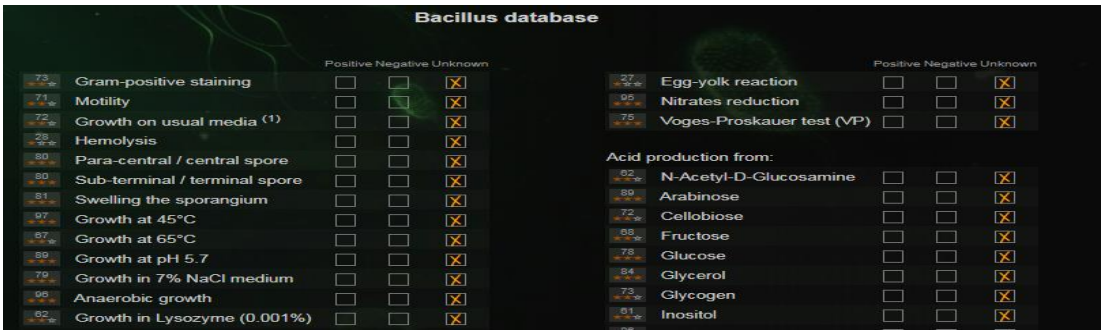


Figure 20 : Capture d'écran de l'affichage du programme d'identification bactérienne Online -ABIS-

II.2.Identification des souches :

les résultats obtenus suite à l'introduction des résultats des tests biochimiques des galeries API 20E dans la grille du **programme d'identification online (ABIS)** sont présentés dans le tableau suivant **(Tableau 13)**

Tableau 13 : Identification des souches

LES SOURCES	**Hammam E'ssalhin**	**Hammam righa**	**Hammam kessana**
LES SOUCHES	**BA5:***Bacillus carboniphilus* **BA9** : *Bacillus firmus* **BA11:** *Bacillus firmus* **BA12:***Geobacillus Stearothermophilus* **BA13:***Bacillus sporothermodurans* **BA15 :***Lysinibacillus sphaericus* **BA17 :** *Bacillus firmus*	**I1**:*Bacillus sporothermodurans* **I2**:*Bacillus carboniphilus* **I4** : *Bacillus cereus* **I5** : *Bacillus cereus ou Bacillus cereus* **I6** : *Bacillus licheniformis* **I10** :*Bacillus carboniphilus* **I15'** :*Paenibacillus panacisoli* **I17'**:*Lysinibacillus sphaericus* **I18** :*Bacillus amyloliquefaciens*	**W1:***Brevibacillus brevis* **W2:** × **W4:***Paenibacillus panacisoli* **W5:***Bacillus circulans* **W7:***Bacillus coagulans* **W10:** *Paenibacillus macerans* **W15:** *Brevibacillus brevis* **H7:***Lysinibacillus sphaericus* **H8:***Paenibacillus spp.* **H12:***Aneurinibacillus aneurinilyticus* **H14:***Lysinibacillus sphaericus*

Les milieux de culture utilisés nous ont permis d'isoler une large panoplie de microorganismes thermophiles aérobies appartenant à plusieurs groupes taxonomiques.

Notre étude a révélé une prédominance des souches appartenant au genre Bacillus à savoir : *Bacillus sporothermodurans, Bacillus carboniphilus, Bacillus cereus, Bacillus licheniformis, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus firmus, Bacillus circulans, Bacillus Coagulans.* le genre Bacillus comporte une large diversité des bactéries aérobies et aérobie-anaérobies facultatives, en forme de Bâtonnets, Gram positif, formant des endospores, des hétérotrophes pouvant utiliser une large gamme de sources de carbone. Cependant, la nouvelle classification a permis le reclassement des espèces du genre Bacillus dans des nouveaux genres Amphibacillus, Alicyclobacillus, Paenibacillus, Aneurinibacillus et Brevibacillus, Halobacillus, Virgibacillus, Gracilibacillus, Sulfobacillus et Salibacillus, Anoxybacillus, Coprobacillus, Thermobacillus, Filobacillus, Geobacillus, Ureibacillus, Jeotgalibacillus, Sulfobacillus et Marinibacillus **(Adiguzel et *al,* 2016)**

Les thermophiles facultatifs font partie du genre Bacillus et ont l'aptitude à croitre à des températures mésophiles et thermophiles (30-55 °C), en fonction de la souche. Quelques exemples d'espèces comprennent *Bacillus coagulans, B.lichenifrmis, B.pumilus, B.sporothermodurans et Bacillus subtilis* **(Barbarous et Gulsun., 2014).** Nos souches ont été capables de multiplier à des températures comprises entre 45 et 60 °C

En outre, nous avons pu isolé d'autres souches appartenant à d'autres genre comme *Brevibacillus brevis* et *Geobacillus Stearothermophilus.* Nombreuses études ont rapporté l'isolement de représentants d'espèces thermophiles sporulantes de Bacillales par méthodes culturales à partir d'environnements très variés et géographiquement distincts **(Mehta et Satyanarayana, 2013)**. Par exemple, des représentants de plusieurs espèces de Geobacillus, de Anoxybacillus, de Bacillus, de Brevibacillus et de Thermoactinomyces ont été isolés de sources géothermales en Algérie**(Gomri et *al.*, 2019; Benammar et *al.*, 2020; Larbi daouadji et *al.*, 2015; Mekki et Aissat, 2019; Bouacem et *al.*, 2016)**, en Arménie **(Panosyan, 2017)**, en Bulgarie **(Derekova et *al.*, 2008a; Kambourova, 2018);** en Chine **(Song et *al.*, 2013),** au Maroc **(Aanniz et *al.*, 2015)**, en Tunisie **(Sayeh et *al.*, 2010)**, en Turquie **(Adiguzel et *al.*, 2009)** et en Russie **(Foti et *al.*, 2008).**

L'espèce *Geobacillus Stearothermophilus* isolée à partir de la source hydrothermale de Hammam e'ssalhine de Médéa a révélé une dégradation de plusieurs sucres aprés lecture de la galerie API20E à savoir le saccharose, rhamnose, arabinose, ..Des études antérieures ont montré la capacité des bactéries thermophiles à croitre sur le glucose et/ou les sucres fermentescibles comme unique source de carbone et d'énergie, qui est

le cas des espèces du genre Geobacillus **(Nazina et *al.*, 2001; Marchant et *al.*, 2002).**

La taxonomie et surtout l'identification des bacilles thermophiles ont suscité un intérêt considérable au cours des dernières décennies. Il a été démontré que les représentants du genre Bacillus et des genres apparentés (comme Brevibacillus, Anoxybacillus et Geobacillus) sont les aérobies thermophiles les plus fréquemment isolés des milieux aquatiques géothermiques terrestres. Ce qui est en accord avec nos résultats vu qu'on a fait nos prélevements à partir des sources géothermales.

La souche *Aneurinibacillus aneurinilyticus* a été isolée à partir de la sources thermale de Hammam Kessana de Bouira. Farahmand et ses collaborateurs en (2009) ont révélé la présence de cette souche dans une source hydrothermale en Iran.

II.3. L'activité enzymatique

Un screening des activités amylolytiques, protéolytiques, lipolytiques et cellulolytiques a été effectué. La présence de ces activités a été détectée en utilisant les substrats, amidon, pectine, caséine, jaune d'oeuf, tween 20, tween 80, et carboxymethylcellulose (CMC) **(Figure 18-22).**

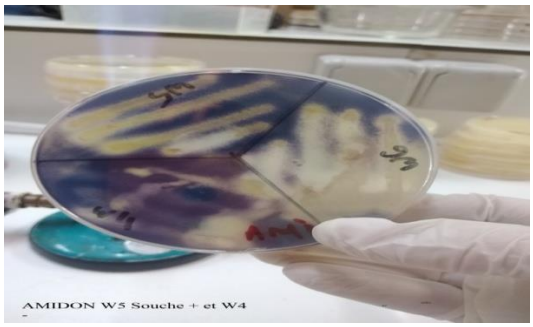


Figure 21:Amidon W4 – / W5 +

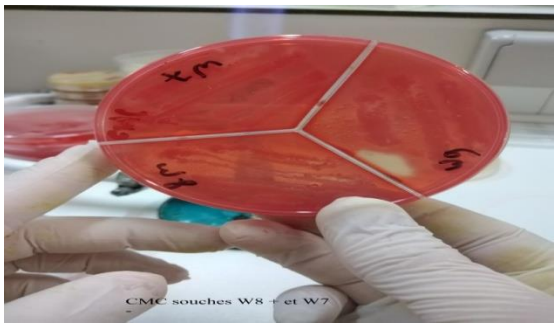


Figure 22: CMC W7 – / W8 +

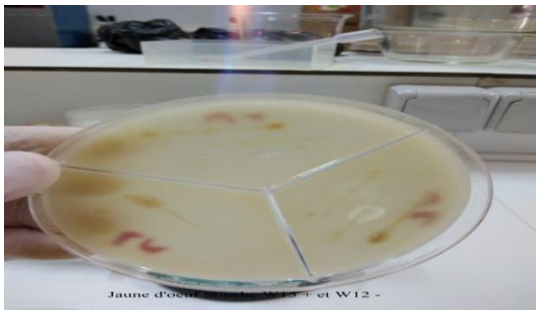


Figure 23 :Jaune d'œuf W12 – / W13 +

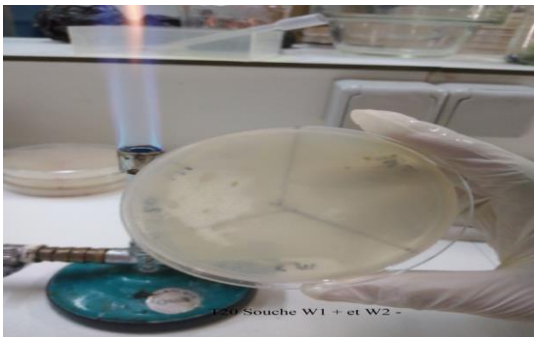


Figure 24: T 20 W1 + / W2 –

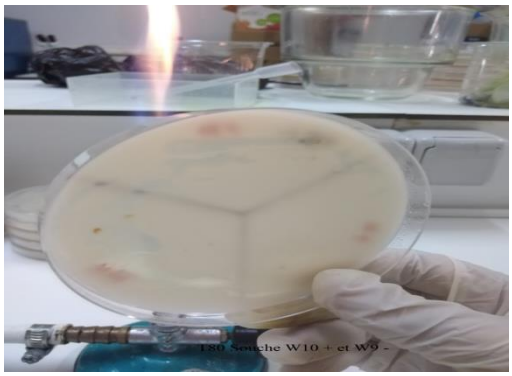


Figure 25 :T 80 W9 – / W10 +

Les résultats des tests enzymatiques effectués sont présentés dans le **Tableau 14.**

Tableau 14 : Caractérisation biochimique des isolats des trois sites.

Souches	Amidon	T20	T80	Jaune d'Œuf	CMC	Lait écremé	Pectine
A	+	+	+	+	+	-	-
B	+	+	+	+	-	-	-
C	+	+	+	+	-	-	-
D	+	+	-	-	-	+	-
E	+	+	+	-	-	-	-
F	+	+	+	-	-	+	-
G	-	+	-	-	-	-	-
H	-	+	+	-	+	-	+
I	-	+	-	-	-	-	-
J	-	+	-	-	-	-	-
K	-	+	+	-	-	-	-
L	-	+	+	-	-	-	+
M	+	+	-	-	+	-	-
N	-	-	-	-	+	-	-
O	-	+	+	-	+	-	+
P	+	+	+	-	+	-	+
A3	+	+	+	-	+	-	-
A4	+	+	+	+	-	-	-
A5	+	+	+	-	+	-	-
A7	+	+	+	-	+	-	-
A8	+	+	+	-	+	+	-
A9	-	+	+	-	+	-	+
iA 1	+	+	+	+	-	+	+
iA 2	-	+	+	+	-	+	+
iA 3	-	+	+	+	-	-	-
iA 4	+	+	+	-	+	-	+
iA 5	+	+	+	-	+	-	+
iA 6	+	+	+	-	+	-	-
i 10	+	-	-	+	-	-	-

i 15	-	+	+	+	-	-	-
i 15'	-	-	-	+	+	-	-
i 17'	+	-	+	+	-	-	+
i 18	+	-	+	-	-	-	-
W1	+	+	-	+	-	-	-
W2	+	-	-	+	-	-	-
W3	+	+	-	+	-	+	-
W4	-	-	-	-	+	+	-
W5	+	-	+	-	+	+	-
W6	+	-	+	-	+	+	-
W7	-	-	-	-	-	-	-
W8	+	-	-	-	+	-	-
W9	+	-	-	-	-	-	-
W10	+	+	-	-	+	-	-
W11	-	-	-	-	+	+	-
W12	+	+	-	-	+	+	-
W13	+	-	-	+	-	+	-
W14	+	-	-	+	-	-	+
W15	+	-	-	-	-	-	-
H1	-	+	-	-	-	+	-
H2	-	+	-	-	-	+	-
H3	+	+	-	-	-	+	-
H4	+	+	-	-	-	-	+
H5	-	+	+	-	-	-	-
H6	-	-	+	-	-	-	+
H7	-	+	+	+	-	-	-
H8	-	+	-	-	+	-	+
H9	-	+	+	-	-	-	-
H10	+	-	-	-	+	-	-
H11	-	-	-	-	-	-	-
H12	+	-	-	-	-	-	-
H13	+	-	-	+	+	-	-
H14	+	-	-	-	+	-	-
H15	-	-	-	-	-	-	-

- Remarque :

(+) : hydrolyse complet

(-) : absence de l'hydrolyse

D'après nos résultats, il est clair que l'activité **lipolytique** est prédominante avec 40 Souches pouvant hydrolyser le Tween20 et 30 souches pouvant hydrolyser le Tween 80, suivi par l'activité **amylolytique** avec 38 souches amylase positif. Selon **Colwell et Grigorova**

(1987), une gélose nutritive à amidon peut être utilisée pour détecter la présence d'une amylase produite par des bactéries.L'amidon non hydrolysé réagit avec l'iode et donne une couleur bleu foncé alors que les zones d'hydrolyse sont révélées par l'absence de coloration autour des cultures.

En outre, seulement 24 souches ont dégradé le carboxymethylcellulose (CMC). La pectine, la caseine et la lécithine ont été hydrolysées par 14, 14 et 18 souches respectivement.

Les Bacillus thermophiles et hyper thermophiles représentent une bonne source d'enzymes avec des avantages absolus, pour cela, ils sont les plus employés en biotechnologie **(Lagzian et *al.*, 2012).** ces bactériesont développé une variété de stratégies moléculaires pour survivre aux conditions environnementales extrèmes. Pour l'utilisation des substrats naturels, l'amidon par exemple, un nombre de bactéries thermophiles, produisent une gamme d'enzymes amylolytiques (Į-amylase, Į-glucosidase, glucoamylase, pullulanases, cyclodextrine glycosyltransferase). Elles sont également capables de dégrader d'autres polysaccharides, tels que le glycogène, fourni par des cellules animales ou microbiennes **(Bertoldo et Antranikian, 2001).**

II.4. Les activités enzymatiques des souches identifiées:

Le tableau suivant révèle le profil enzymatique des souches identifiées vis à vis les septs enzymes choisies**.**

Tableau 15 : Les activités enzymatiques des souches identifiées

Souches	Amylase	Esterase Tween 20	Esterase Tween 80	Lécithinase	Cellulase	Caseinase	Pectinase
BA5:*Bacillus carboniphilus*	+	+	+	-	+	-	-
BA9 *Bacillus firmu*	-	+	+	-	+	-	+
BA11: *Bacillus firmu*	-	+	+	-	-	-	-
BA12:*Geobacillus Stearothermophilus*	-	+	+	-	+	-	+

BA13:*Bacillus sporothermodurans*	+	+	-	-	+	-	-
BA15 :*Lysinibacillus sphaericus*	-	+	+	-	+	-	+
BA17 : *Bacillus firmus*	+	+	+	-	+	-	-
I1:*Bacillus sporothermodurans*	+	+	+	+	-	+	+
I2:*Bacillus carboniphilus*	-	+	+	+	-	+	+
I4 : *Bacillus cereus*	-	+	+	+	-	-	-
I5 : *Bacillus cereus*	+	+	+	-	+	-	+
I6 : *Bacillus licheniformis*	+	+	+	-	+	-	+
I10 :*Bacillus carboniphilus*	+	+	+	-	+	-	-
I15' :*Paenibacillus panacisoli*	-	-	-	+	+	-	-
I17':*Lysinibacillus sphaericus*	+	-	+	+	-	-	+
I18 :*Bacillus amyloliquefaciens*	+	-	+	-	-	-	-
W1:*Brevibacillus brevis*	+	+	-	+	-	-	-
W4:*Paenibacillus panacisoli*	-	-	-	-	+	+	-
W5:*Bacillus circulans*	+	-	+	-	+	+	-
W7:*Bacillus Coagulans*	-	-	-	-	-	-	-

W10:*Paenibacillus macerans*	+	+	-	-	+	-	-
W15:*Brevibacillus brevis*	+	-	-	-	-	-	-
H7:*Lysinibacillus sphaericus*	-	+	+	+	-	-	-
H8:*Paenibacillus spp.*	-	+	-	-	+	-	+
H12:*Aneurinibacillus aneurinilyticus*	+	-	-	-	-	-	-
H14:*Lysinibacillus sphaericus*	+	-	-	-	+	-	-

- Remarque : (+) : hydrolyse complet (-) : absence de l'hydrolyse

Les résultats obtenus confirment la grande capacité des souches isolées de sources thermales à synthétiser des enzymes hydrolytiques extracellulaires. Ces enzymes sont des métabolites essentielles qui permettent aux bactéries de cataboliser les éléments nutritifs du milieu afin d'assurer leur vie. Par ailleurs, on utilise ces capacités naturelles au profit de la biotechnologie dans divers domaines **(Zhao et *al.*, 2010).** Les espèces de groupe *Bacillus* sont très intéressantes pour le développement d'application industrielles pour plusieurs raisons. Leur taux de croissance rapide menant à des cycles de fermentation courtes, leur capacités à secréter des protéines dans le milieu extracellulaire ainsi que le fait que certaines espèces soient sur la liste du GRAS **(Generally Regarded As Safe)** de la FDA **(Food and Drug Administration)** suscitent l'intérêt des industriels **(Schallmey et *al.*, 2004).**

Une plus grande capacité d'adaptation implique des mécanismes métaboliques plus développés, comparativement à des organismes qui en sont dépourvus **(Cohen, 2011)**

Les bactéries à Gram positif représentent une bonne source d'amylases, et les espèces desdifférents groupes de *Bacillus* fournissent un large panel d'optima de pH et de températurespour ces enzymes **(Vieille et *al.*, 2000).** Des souches de *Geobacillus* ont été étudiéeségalement pour leur capacité de dégrader plusieurs polysaccharides, notamment la cellulose.Leurs enzymes ont été proposées pour des applications industrielles et environnementales **(Marchant et Banat, 2010).** En outre, les membres thermophiles des

Bacillaceae fournissent d'importantes protéases thermostables à l'industrie **(Rao et *al.*, 1998 ; Haaki and Rakshit, 2003)**. Les lipases sont également produites par les espèces du genre *Geobacillus*, comme *Geobacillus thermoleovorans* qui possède des activités lipolytiques extracellulaires avec des taux de croissance élevés sur des substrats comme l'huile d'olive, l'huile de soja, la tributyrine et les tween 20, 40 et 80 **(Lee et *al.*, 1999).** En somme, les membres des genres thermophiles des Bacillales sont connus pour leur capacité à produire des enzymes d'hydrolyse et des biofilms **(Burgess et *al.*, 2010)**

Nos résultats concordent avec ceux de Malkawi et Al-Omari qui ont étudié la diversité microbienne des cinq sources thermales en Jordanie, en utilisant à la fois des approches microbiologiques et moléculaires. La plupart des bactéries isolées étaient des bâtonnets à Gram positif (94.7 %) et (90.9 %) appartiennent au genre Bacillus. Une étude similaire faite au Maroc en 2015 a révélé une dominance du genre Bacillus En outre, 71,25 %, 50,41 % et 5,41 % du total des souches présentaient respectivement une forte activité amylolytique, protéolytique ou cellulolytique.

Conclusion général & perspectives

Conclusion

Les extrêmophiles sont des microorganismes qui possèdent des possibilités d'applications dans plusieurs domaines, incluant l'agriculture, l'industrie, la pétrochimie, la médecine, l'alimentation et la bioremédiation des sols. Les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles sont des producteurs très connus des enzymes thermostables, les produits antimicrobiens et les composés bioactifs qui ont une importance dans les applications biotechnologiques.

L'isolement et l'identification des bactéries thermophiles productrices des thermozymes constituent l'objectif de cette étude. Pour cela, nous avons choisi trois sources hydrothermales (Hammam Essalihine dans la région de wilaya de MEDEA, de Hammam K'sana dans la région de wilaya de BOUIRA et de Hammam Righa de wilaya de AIN DEFFLA), et dont deux entres eux n'ont jamais été exploitées auparavant.

L'ensemencement des echantillons d'eaux et de sédiments sur 3 milieux gélosés spécifiques (TTM, T162M et TM162M)nous a permis d'isoler 63 souches thermophiles dont la majorité des souches étaient des bâtonnets à Gram positif,possédant généralement une cytochrome oxydase et une catalase.

Ces souches ont fait l'objet d'une évaluation des activités enzymatiques sur septs milieux gélosés additionnés de différents substrats : amidon, caséine,carboxymethylcellulose, Tween 80, tween 20 et Jaune d'œuf , pour la détermination des activités amylolytique, protéolytique, cellulolytique et lipolytique respectivement. Les résultats obtenus ont révélé une diversité de l'activité hydrolytique des enzymes extracellulaires de ses souches avec la prédominance de l'activité amylolytique avec 38 souches amylase positif.

En effet cette recherche a permis l'exploitation d'un biotope extrême (Hammam Essalihin, Hammam K'sana et Hammam Righa). Ces sites thermaux abritent une microflore particulière possèdent un optimum de température. D'autres études détaillées des isolats pourront être réalisées dans le but de renfoncer leur potentiel, optimiser les paramètres de croissance pour une activité enzymatique extracellulaire optimale et aussi d'évaluer l'activité antimicrobienne de ses souches vis à vis de souches microbiennes tests.

Références bibliographiques

A :

- **Aanniz T., Ouadghiri M., Melloul M., Swing J., Elfahim E., Ibijbijben J., Ismaili M., Ammar M. 2015. Thermophilic bacteria in Maroccan hot springs, salt marshes, and desert soils. Brazilian journal of microbiology, Vol. 46, no. 2, p.443-453.**
- **Adiguzel A., Bariş Ö., Sahin F. 2009.** Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. Journal of microbiological methods.79:321-328.

- **Alain K., Geslin C., Godfroy A., Prieur D. 2010.** Les thermophiles [en ligne] https://wwz.ifremer.fr/content/download/12612/file/fiche_big2010_thermophiles Consulté le 3/6/2019
- **Alain, K. 2003.** Approches culturates et moleculaires des assemblages microbiens associates aux polychetes hydrothermaux de la famille Alvinellidae. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale - França, 190p.
- **Alber S., Vossenberg J., Driessen A. and Konings W., 2001**. Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions, Extremophiles, 5: 285-294
- **Alrumman, S., Yasser, S., Mostafa, M., Al-Qahtani, S., Tarek, H & Taha, T. 2018.** Hydrolytic Enzyme Production by Thermophilic Bacteria Isolated from Saudi Hot Springs. Open Life Sci, **13**: 470–480.
- **Amarouche-Yala, S., Benouadah, A., Bentabet, A.E.O &Lopez-Garcıa. P. 2014.** Morphological and phylogenetic diversity of thermophilic cyanobacteria in Algerian hot springs. Extremophiles, 1-13.
- **Anbu, P., Hilda, A., Gopinath, S.C. 2004**. Keratinophilic fungi of poultry farm and feather dumping soil in Tamil Nadu, India. Mycopathologia, **158**(3), 303-9.
- **Andronopoulou, E., Vorgias, C.E. 2004.** Isolation, cloning, and overexpression of a chitinase gene fragment from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus:* semi-denaturing purification of the recombinant peptide and investigation of its relation with other chitinases. Protein Expression and Purification, 35(2), 264-271.

Références bibliographiques

- **Antranikian G. 2009.** Extremophiles and Biotechnology in: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester; P: 1-5.
- **Antranikian, G. 2008.** Industrial relevance of thermophiles and their enzymes. Thermophiles: Biology and technology at High Temperatures, CRC Press,368
- **Antranikian, G., Vorgias, C.E., Bertoldo, C. 2005.** Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts., in: Marine biotechnology I, Springer, 219-262.
- **Arijit, D., Sourav, B., Naimisha, R., Rajan, S. 2013**. Improved production and purification of pectinase from Streptomyces sp. GHBA10 isolated from Valapattanam mangrove habitat, Kerala, India. International Research Journal of Biological Sciences, 2, 16-22.
- **Arya, M., Joshi, G.K., Gupta, A.K., Kumar, A., Raturi, A. 2015.** Isolation and characterization of thermophilic bacterial strains from Soldhar (Tapovan) hot spring in Central Himalayan Region, India. Ann Microbiol, **65**:1457–1464.
- **Atsumi, T., Ueha, T. 1983.** Protease, collagenase, fibrinolytic activities and vascular permeability of a cytoplasmic extract of Veillonella alcalescens, a Gram-Negative bacterium. Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi, **25**(3), 526-34.
- **Aygan, A., Arikan, B. 2008.** A new halo-alkaliphitic, thermostable endoglucanase from moderately halophilic Bacillus sp. C14 isolated from Van soda lake. International Journal of Agriculrure and Biology, 10, 369-374.

B:

- **Barbarous Ozer., GulsunAkdemir-Evrendilek. 2014.** Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments. CRC Press. P: 13.
- **Baker-Austin C. and Dopson M. 2007.** Life in acid: pH homeostasis in acidophilic, Trends in Microbiology, 15: 165-171
- **Banik, R.M., Prakash, M. 2004.** Laundry detergent compatibility of the alkaline protease fromb Bacillus cereus. Microbiological Research, **159**(2), 135-40.
- **Ben Elhoul, M., Zaraî-Jaouadi, N., Rekik, H., Bejar, W., Boulkour-Touioui, S., Hmidi, M., Badis, A., Bejar, S., Jaouadi, B. 2015**. A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from Streptomyces koyangensis TN650. International Journal of Biological Macromolecules, **79**, 871-882.

- **Bhat, M. 2000.** Cellulases and related enzymes in biotechnology . Biotechnology Advances, 18(5), 355- 383.
- **Borgi, M.A., Srih-Belguith, K., Ali, M.B., Mezghani, M., Tranier, S., Haser, R., Bejar, S. 2004.** Glucose isomerase of the Streptomyces sp. SK strain purification, sequence analysis and implication of alanine 103 residue in the enzymne thermostability and acidotolerance. Biochimie, 86(8), 561-568.
- **Bouacem, K., Bouanane-Darenfed, A., Boucherba, N., Joseph, M., Gagaoua, M., Ben Hania, W., Kecha, M., Benallaoua, S., Hacène, H., Ollivier, B & Fardeau, M.L. 2014.** Partial Characterization of Xylanase Produced by Caldicoprobacter algeriensis, a New Thermophilic Anaerobic Bacterium Isolated from an Algerian Hot Spring. Appl Biochem Biotechnol, **174**:1969–1981.
- **Bouanane-darenfed a., Fardeau m.l., Gregoire p., Joseph M., Kebbouche-Gana S., Benayad T., Hacene H., Cayol J.l., Ollivier B. 2011.** Caldicoprobacter algeriensis sp. nov. a new thermophilic anaerobic, xylanolytic bacterium isolated from an Algerian hot spring. Curr. Microbiol., 62:826-832.
- **Bouanane-Darenfed, A., Fardeau,M.L., Gre´goire, P., Joseph, M., Kebbouche-Gana, S., Benayad, T., Hacene, H., Cayol, J.L & Ollivier, B. 2011.**Caldicoprobacter algeriensis sp. nov. a New Thermophilic Anaerobic, Xylanolytic Bacterium Isolated from an Algerian Hot Spring. Curr Microbiol, **62**:826–832.
- **Bredberg K., Persson J., Christiansson M., Stenberg B., Holst O. 2001.** Anaerobic desulfurization of ground rubber with the thermophilic archaeon Pyrococcus furiosus-a new method for rubber recycling. Appl. Microbiol. Biotechnol., 55:43-48.
- **Burgess S.A., Lindsay D., Steve H. Flint S.H. 2010.** Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. Intern. J. of Food Microbiol., 144:215-225.
- **Brown, S.H., Sjeholm, C. Kelly, R.M. 1993**. Purification and characterization of a highly thermostable glucose isomerase produced by the extremely themophilic eubacterium, Thermotoga maritima. Biotechnology and Bioengineering, 41(9), 878-886.

C:

- **Cai, C.G., Chen, J.S., Qi, J.G., Yin, Y., Zheng, X.D. 2008**. Purification and characterization of keratinase from a new Bacillus subtilis strain. Journal of Zhejiang University Science B, **9**(9), 713-720.

- **Calteau, A. 2005.** Relations évolutives entre les bactéries et les archées hyperthermophiles. Thèse de doctorat en microbiologie, université de Bretagne occidentale, France, 21-23.
- **Casamayor, E.O. 2009 .**protists, bacteria and fungi: planktonic and attached.Elsevier Inc, 167-181.
- **Crabb, W.D., Mitchinson, C. 1997**. Enzymes involved in the processing of starch to sugars Trends in Biotechnology, 15(9), 349-352 T

D:

- **Demirjian D.C., Morís-Varas, F & Cassidy, S.C. 2001.** Enzymes from extremophiles. Current Opinion in Chemical Biology, **5**: 144–151.
- **De Vos, P.D. 2015** Ludwig, W.; Schleifer, K.-H.; Whitman, W.B. "Paenibacillaceae" fam. nov. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, **2015**
- **Dinsdale A.E., Halket G., Coorevits A., Van Landschoot A., Busse H.J., De Vos P., Logan N.A. 2011.** Emended descriptions of Geobacillus thermoleovorans and Geobacillus thermocatenulatus. Int. J. of Syst. and Evo. Microbio., 61, 1802–1810.

E:

- **Einarson, H., B. G. Snygg et C. Eriksson. 1983.** Inhibition of bacterial growth by Maillard reaction products. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 31, no. 5, p. 1043-1047.
- **Einarson, H., B. G. Snygg et C. Eriksson. 1983.** Inhibition of bacterial growth by
- **Einarsson, H., B. G. Snygg et C. Eriksson: 1983** Inhibition of Bacterial Growth by Maillard Reaction Products Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 31, no. 5, p. 1043-1047.

F:

- **Fekraoui, A & Kedaid, F-Z. 2005.**Geothermal resources and uses in Algeria: a country update report. In: Proceedings.

- **Fenghour, H., Ladjama, A., Taibi, Z. 2002.** Recherche de l'activité pectionolytique chez 22 souches de champignons microscopiques isolées d'un sol de la region d'El-Kala. Technologies Avancées, 14(1), 55-60.
- **Ferrera I., Reysenbach A L. 2007.** Thermophiles in: Encyclopedia of life
- **Forgacs, G., Alinezhad, S., Mirabdollah, A., Feuk-Lagerstedt, E., Horvath, I.S. 2011**. Biological treatment of chicken feather waste for improved biogas production. Journal of Environmental Sciences, **23**(10), 1747-53.

G :

- **Gajju, H., Bhalla, T., Agarwal, H. 1996**. Thermostable alkaline protease from thermophilic Bacillus coagulans PB-77. Indian Journal of Microbiology, **36**, 153-156.
- **Gao, J., Bauer, M.W., Shockley, K.R., Pysz, M.A., Kelly, R.M. 2003.** Growth of hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus on chitin involves two family 18 chitinases. Applied and Environmental Microbiology, 69(6), 3119-3128.
- **Ghani, M. 2001**. Protein-containing granules and granule formulations, Vol. Patent WO 01/29170 A1.
- **Giacobbe, S., Pepe, O., Ventorino, V., Birolo, L, Vinciguerra, R., Faraco, V. 2014.** Identification and Characterisation of a Pectinolytic Enzyme from Paenibacillus xylanolyticus. BioResources, 9(3), 4873-4887.
- **Gololobov, M.Y., Stepanov, V.M., Voyushina, T.L., Morozova, I.P., Adlercreutz, P. 1994**. Side reactions in enzymatic peptide synthesis in organic media: Effects of enzyme, solvent, and substrate concentrations. Enzyme and Microbial Technology, **16**(6), 522-528.
- **Gomes, L., Gomes, J., Steiner, W. 2003.** Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium Rhodothermus marinus: production and partial characterization. Bloresource Technology, 90(2), 207-214
- **Gomri, M.A. 2012.** Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermales terrestres de l'Est algérien.Mémoire de Magister en Sciences Alimentaires, Universié MENTOURI-CONSTANTINE**.**136p**.**
- **Gomri, M.A. 2019.** Thèse de doctorat Contribution à l'étude de la diversité des bactérie thermophiles de quelques environnements chauds algeriens et essai de

production et de caractérisation de leur protease extracellulaires , Universié MENTOURI-CONSTANTINE 335p.

- **Gomri, M.A., Khaldi, T.E.M & Kharroub, K. 2018.** Analysis of the diversity of aerobic, thermophilic endospore-forming bacteria in two Algerian hot springs using cultural and non-cultural methods.Annals of Microbiology**,68:**915–929.
- **Gregoire P., Fardeau M.L., Guasco S., Bouanane A., Michotey V., Bonin P., Dubourg K., Cambar J., Ollivier B. 2009.** Les micro-organismes de l'extrême. Press Therm Climat. Vol.146, p.49-61.
- **Guang, C., Phillips, R.D. 2009**. Purification, activity and sequence of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from alcalase hydrolysate of peanut flour. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **57**(21), 10102-6.
- **Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K.. Chauhan, B. 2003.** Microbial a-amylases: a biotechnological perspective. Process Biochentsty 38(11), 1599-1616.

H :

- **Haki , G. , Rakshit , S. 2003.** Developments in industriatly important thermostable enzymes : a review . Bioresource Technology , 89 (1) . 17-34.
- **Harley J.P., Prescott L.M. 2002.** Laboratory Exercises in Microbiology. 5ème éd. Mc Graw Hill. 466p.
- **Horikoshi K. 1999.** Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63: 735–750.
- **Horikoshi, K & Bull, A.T. (2011).** Prologue Definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emergingfields of extremophiles In Extremophiles Handboo. Eds. Springer.
- **Hupé, J.P. 2008.** Enrichissement et recherche de certaines, activités enzymatiques produites par des bactéries aérobies themophiles. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maitre ès Science (M Sc.) en Microbiologie appliquće Umiversité du Québee, Canada, 161p.

I :

- **Irwin J. A., Baird A. W. 2004**. Extremophiles and their application to veterinary medicine. Irish Veterinary Journal. Volume 57 (6).

- **Ismail, A.M. S., Housseiny, M.M., Abo-Elmagd, H.I., El-Sayed, N.H., Habib, M. 2012**. Novel keratinase from Trichoderma harzianum MH-20 exhibiting remarkable dehairing capabilities. International Biodeterioration & Biodegradation, 70, 14-19.

J :

- **Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R. 2005.** Microbial pectinolytic enzymes: a review. Process Biochemistry, 40(9), 2931-2944.
- **Joshi, S., Satyanarayana, T. 2013.** Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium Bacillus lehensis. Bioresoure Technoolgyl, **131**, 76-85.

K :

- **Kashayp, D.R., Vohra, P.K., Soni, S.K., Tewari, R. 2001.** Degumming of buel (Grewia optiva) bast fibres by pectinolytic enzyme from Bacillus sp. DT7. Biotechnology Letters, 23(16), 1297- 1301.
- **Kashyap, D., Chandra, S., Kaul, A., Tewari, R. 2000.** Production, purification and characterization of pectinase from a Bacillus sp. DT7. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 16(3), 277-282.
- **Kecha, M., Benallaoua, S., Touzel, J.P., Bonaly, R & Duchiron. F. (2007).**Biochemical and phylogenetic characterization of a novel terrestrial hyperthermophilic archaeon pertaining to the genus Pyrococcus from an Algerian hydrothermal hot spring. Extremophiles, **11**:65–73.
- **Kedaid, F.Z. 2007.** Database on the geothermal resources of Algeria. Geothermics, **36**:265–275.
- **Kim, K.W & Lee, S.B. 2003.** Inhibitory Effect of Maillard Reaction Products on Growth of the Aerobic Marine Hyperthermophilic Archaeon Aeropyrum pernix. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,**69**(7) :4325–4328.
- **Kim, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H., Choi, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I., Lee, S. 1996**. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from Bacillus sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. Applied and Environmental Microbiology, **62**(7), 2482-8.

- **Kimura, H., Mori, K., Nashimoto, H., Hattori, S., Yamada, K., Koba, K., Yoshida, N., Kato, K. 2010.** Biomass production and energy source of thermophiles in a Japanese alkaline geothermal pool. Environmental Microbiology, 12(2), 480-489
- **Koch, R., Canganella, F., Hippe, H., Jahnke, K., Antranikian, G. 1997.** Purification and properties of a thermostable pullulanase from a newly isolated thermophilie anaerobic bacterium, Fervidobacterium pennavorans Ven5. Applied and Enviranmental Microbiology, 63(3), 1088- 1094.
- **Kudrya, V., Simonenko, I. 1994**. Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of Bacillus subtilis. Applied Microbiology and Biotechnology, **41**(5), 505-509.
- **Kumar, C.G., Malik, R.K., M.P., T. 1998**. Novel enzyme-based detergents: an indian perspective. Current Science, **75**, 1312-1318.
- **Kumar.S., Dangi. A.K.,Shukla, P.,Baishya.D & Khare .S.k. 2019.**Thermozymes: Adaptive strategies and tools for their biotechnological applications.Bioresource Technology, **278 :**372-382.

L:

- **Larbi, D.K. 2015.**isolement et caracterisation des souches productrices de lipase. Thèses de Doctorat en Microbiologie Moléculaire Et Protéomics,universite djillali liabes sidi balabesse.165p.
- **Larreta-Garde V., 2011.** Enzymes en agroalimentaire, Ed Lavoisier. 408P
- **Lewinson O., Padan E. and Bibi E. 2004.** Alkalitolerance: A biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis. P.N.A.S., 39: 14073 - 14078.
- **Li, Y., Zhang, L., Niu, D., Wang, Z., Shi, G. 2012.** Cloning, expression, characterization, and biocatalytic investigation of a novel bacilli thermostable type I pullulanase from Bacillus sp. CICIM 263. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(44), 11164-11172.
- **Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. 2002.** Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Micrābiology and Molecular Biology Reviews, 66(3), 506- 577.

M :

- **Macedo, A.J., da Silva, W.O.B., Gava, R., Driemeier, D., Henriques, J.A.P., Termignoni, C. 2005**. Novel keratinase from Bacillus subtilis S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. Applied and Environmental Microbiology, **71**(1), 594-596.
- **Macelroy, R. D**. Some comments on the evolution of extremophiles. Biosystems, 1974, 6(1), 74-75. [https://doi.org/10.1016/0303-2647(74)90026-4]
- **Madigan M. T. and Martino J. M. 2006.** Brock Biology of Microorganisms, 11th ed.; Pearson Education: Upper Saddle River, N. J., USA.
- **Madigan M., Martinco J. 2007.** Biologie des micro-organismes. 11ème éd. Paris : Pearson éducation France.1047p.

Maillard reaction products. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 31, no.

- **Mandal, B.B., Kundu, S.C. 2010**. Biospinning by silkworms: silk fiber matrices for tissue engineering applications. Acta Biomateriala, **6**(2), 360-71.
- **Mathis b. J., Marshall C. W., milliken C. E., makkar R. S., Creager S. E., May H. D. 2008**. Electricity generation by thermophilic microorganisms from marine sediment. Appl. Microbiol. Biotechnol., 78:(1):147-155.²
- **Mehta, d & Satyanarayana, T. 2013.**Chapter 1 Diversity of Hot Environments and Thermophilic Microbe.Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial 3 Biotechnology. Biotechnology of Thermophiles,4-60.
- **Minic, Z., Serre, V & Hervé, G. 2006.** Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes.Comptes rendus biologies, **329:**527–540**.**
- **Mohammad, B.T., Al Daghistani, H.I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S. & Kennes, C. (2017).** Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: Bacillus licheniformis and Thermomonas hydrothermalis Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. International Journal of Microbiology,1-12.
- **More, S., Khandelwal, H., Joseph, M., Laxman, R. 2013**. Enzymatic degumming of silk with microbial proteases. Journal of Natural Fibers, **10**(2), 98-111.
- **Moreira-Gasparin, F.G., de Souza, C.G., Costa, A.M., Alexandrino, A.M., Bracht, C.K., Boer, C.G., Peralta, R.M. 2009**. Purification and

characterization of an efficient poultry feather degrading-protease from Myrothecium verrucaria. Biodegradation, **20**(5), 727-36.

- **Morozkina E. V., Slutskaya E. S., Fedorova T. V., Tugay T. I., Golubeva L. I. and Koroleva O. V. 2010.** Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application. Appl. Biochem. Microbiol., 46: 1-14.
- **Mukherjee, A.K. 2007**. Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by Bacillus subtilis strains in laundry detergent formulations. Letters in Applied Microbiology, **45**(3), 330-5.
- Mukhtar S., Zaheer A., Dalaq A., Kauser A., Mehnaz S., (2018). Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. Journal of Proteomics & Bioinformatics, 10(12): 316-319.

N:

- **Nakagawa T., Ishibashi J., Maruyama A., Yamanaka T., Morimoto Y., Kimura H., Urabe T. and Fukui M. 2004.** Analysis of dissimilatory sulfite reductase and 16S rRNA gene fragments from deep-sea hydrothermal sites of the Suiyo Seamount, IzuBonin Arc, Western Pacific, Appl. Environ. Microbiol., 70, 393–403.
- **Neklyudov, A., Ivankin, A., Berdutina, A. 2000**. Properties and uses of protein hydrolysates (Review). Applied Biochemistry and Microbiology, **36**(5), 452-459.
- **Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M., Antranikian G. 1999.** Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol., 51: 711-729.
- **Nilegaonkar, S., Zambare, V., Kanekar, P., Dhakephalkar, P., Sarnaik, S.**
- **2007**. Production and partial characterization of dehairing protease from Bacillus cereus MCM B-326. Bioresource Technology, **98**(6), 1238-1245.

O:

- **Ouali, S. 2008.** Les sources Thermales en Algérie. Division Energie Solaire

P :

- **Panda, M.K., Sahu, M.K & Tayung, K. 2013.** Isolation and characterization of a thermophilic Bacillus sp. With protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. IRANIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, **5**(2) : 159-165.
- **Pandey, A., Dhakar, K., Sharma, A., Priti, P., Sati, S & Kumar, B. 2015**. Thermophilic bacteria that tolerate a wide temperature and pH range colonize the Soldhar (95°C) and Ringigad (80°C) hot springs of Uttarakhand, India. Ann Microbiol,**65**:809–816.
- **Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C., Soccol, V.. Singh, D., Mohan, R. 2000.** Advances in microbial amylases. Biotechnology and Applied Biochemistry, 31(2), 135-152.
- **Park, C. B., S. B. Lee et D. D. Ryu. 2001.** L- pyroglutamate spontaneously formrd from L- glutamate inhibits growth of the hyperthermophilic archaeon Sulfolobus solfataricus. Applied and Environmenat microbiology. Vol. 67, no. 8, p. 3650-3654.
- **Patrick Forterre., 2007.** Microbes de l'enfer, Éd. Belin, Pour la science.
- **Paul, T., Das, A., Mandal, A., Halder, S.K., DasMohapatra, P.K., Pati, B.R., Mondal, K.C. 2014**. Biochemical and structural characterization of a detergent stable alkaline serine keratinase from Paenibacillus woosongensis TKB2: a potential additive for laundry detergent. Waste and Biomass Valorization, **5**(4), 563-574.
- **Pedrolli, D.B., Monteiro, A.C., Gomes, E., Carmona, E.C. 2009.** Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. Open Biotechnology Journal, 9-18.
- **Podar M. and Reysenbach A. L. 2006**. New opportunities revealed by biotechnological explorations of extrêmophiles. Current Opinion in Biotechnology, 17: 250-255.
- **Prakash O., Jaiswal N. 2010.** α-Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. Appl Biochem Biotechnol.Vol.160, no.8. p.2401-2414.
- **Prakash, P., Jayalakshmi, S.K., Sreeramulu, K. 2010**. Production of keratinase by free and immobilized cells of Bacillus halodurans strain PPKS-2: partial characterization and its application in feather degradation and dehairing of the goat skin. Applied Biochemistry and Biotechnology, **160**(7), 1909-1920.

- **Prasong, S., Yaowalak, S., Wilaiwan, S. 2009**. Characteristics of silk fiber with and without sericin component: a comparison between Bombyx mori and Philosamia ricini silks. Pakistan Journal of Biological Sciences, **12**(11), 872-6.

Q:

- **Querellou J., Guezennec J. 2010**. Biotechnologie des extrêmophiles. Editions Tech. Ing. BIO580; P: 1-13.

R:

- **Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. 1998**. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, **62** (3), 597-635.
- **Rehman, S., Shash, A. 2011.** Geothermal resources of Saudi Arabia– country update report. Proceedings World Geothermal Congress. Antalya, Turkey: ACADEMIA.
- **Rubiano-Labrador, C., Díaz‑Cárdenas, C., López, G., Gómez, J &Baena , S. 2019.** Colombian Andean thermal springs: reservoir of thermophilic anaerobic bacteria producing hydrolytic enzymes. Extremophiles, **23**:793–8.

S :

- **Saibi, H. 2009.** Geothermal resources in Algeria. Renew Sustain Energy Rev**13**:2544–2552.
- **Sarethy I. P., Saxena Y., Kapoor A., Sharma M., Sharma S. K., Gupta V. and Gupta S. 2011.** Alkaliphilic bacteria : applications in industrial biotechnology. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 38:769–790.
- **Schlegel H.G., Jannash H.W. 2006.** Procaryotes and their habitats. In: Dworkin M., Falkaws S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackbrandt E. The prokaryotes.(3 è*me* éd). New York: Springer.P.137-184.
  sciences. John Wiley & Sons ; P : 1-9
- **Selvam, K., Vishnupriya, B. 2012**. Biochemical and molecular characterization of microbial keratinase and its remarkable applications. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive, **3**(2).
- **Sharma R., Thakur V., Sharma M., Birkeland N., 2013.** Biocatalysis through thermostable lipases: Adding Flavor to Chemistry. Ch.34. In: Tulasi S, Thermophilic

Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles. (2 ème éd). New York, Springer, pp.905-908. ISBN: 978-94-007-5898-8.

- **Sivasubramanian, S., Manohar, B.M., Rajaram, A., Puvanakrishnan, R. 2008**. Ecofriendly lime and sulfide free enzymatic dehairing of skins and hides using a bacterial alkaline protease. Chemosphere, **70**(6), 1015-1024.
- **Smith, E.L., Markland, F.S., Kasper, C.B., DeLange, R.J., Landon, M., Evans, W.H. 1966**. The complete amino acid sequence of two types of subtilisin, BPN' and Carlsberg. Journal of Biological Chemistry, **241**(24), 5974-6.
- **Souza, R, Soares, R., Nascimento, R., Coelho, R., Gomes, R. 2005.** Effect of different carbon sources on endochitinase production by Colletotrichum gloeosporioides. Current Microhiialogy 51(1), 16-21.
- **Spyros, T. 2003**. Use of dual compartment mixing container for enzyme mixtures useful to treat acne.
- **Staufenberger, T., Imhoff, J.F., Labes, A. 2012.** First crenarchaeal chitinase found in Sulfolobus tokodaii. Microbiological Research, 167(5); 262-269.
- **Sumana, D., Sudarshan, M., Thakur, A.R., RayChaudhuri, S. 2013**. Degumming of raw silk fabric with help of marine extracellular protease. American Journal of Biochemistry & Biotechnology, **9**(1), 12.
- **SÜRÜCÜ, G. 1999**. Growth requirements of thermophilic aerobic microorganisms in mixed cultures for the treatment of strong wastes Water Science and Technology. vol. 40, no. 1, p. 53-60.
- **Suzuki, T., Moraes, T.J., Vachon, E., Ginzberg, H.H., Huang, T.T., Matthay, M.A., Hollenberg, M.D., Marshall, J., McCulloch, C.A., Abreu, M.T., Chow, C.W., Downey, G.P. 2005**. Proteinase-activated receptor-1 mediates elastase-induced apoptosis of human lung epithelial cells. American Journal Respiratory Cell and Molecular Biology, **33**(3), 231-47.

$\mathcal{T}$:

- **Takagi, H., Kondou, M., Hisatsuka, T., Nakamori, S., Tsai, Y.C., Yamasaki, M. 1992**. Effects of an alkaline elastase from an alkalophilic

Bacillus strain on the tenderization of beef meat. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **40**(12), 2364-2368.

- **Tanaka, T., Fukui, T., Fujiwara, S., Atomi, H., Imanaka, T. 2004.** Concerted action of diacetylchitobiose deacetylase and exo-ß-D-glucosaminidase in a novel chitinolytic pathway in the hyperthermophilic archaeon Thermacoccus kodakaraensis KODI. Journal of Biological Chemistry, 279(29), 30021-30027.
- **Tang, X.M., Lakay, F.M., Shen, W., Shao, W.L., Fang, H.Y., Prior, B.A., Wang, Z.X., Zhuge, J. 2004**. Purification and characterisation of an alkaline protease used in tannery industry from Bacillus licheniformis. Biotechnology Letters, **26**(18), 1421-4.

U :

- **Urbieta, M.S., Donati, E.R., Chan,K.G., Shahar, S., Sin,L.L & Goh,K.M. 2014.**Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. Biotechnology Advances, 1-15

V:

- **Van den Burg, B. 2003.** Extremophiles as a source for novel enzymes. Current Opinion in microbioligy, **6** : 213-218.
- **Vieille, C. and Zeikus, G.J. 2001** .Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiol. Mol. Biol, **65** :1-43.
- **Vihinen, M., Mantsiila, P. 1989. Microbial amylolytic enzyme.** Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 24(4). 329-418.

W :

- **Wang, S., Hsu, W., Liang, T. 2010.**Conversion of squid pen by Pseudomonas aeruginosa K187 fermentation for the production of N-acetyl chitooligosaccharides and biofertilizers, Carbohydrate Research, 345(7), 880-885.
- **Weigel J. 1986.** Methods for isolation and study of thermophiles. In: Brock (ed), (181). Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology; P: 17-37.

- **Wilson, S.-A., Young, O., Coolbear, T., Daniel, R. 1992**. The use of proteases from extreme thermophiles for meat tenderisation. Meat Science, **32**(1), 93-103.

Y :

- **Yang, S., Fu, X., Yan, Q., Guo, Y., Liu, Z., Jiang, Z. 2016.** Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium Paenibacillus barengoltzii. Food Chemistry, 192, 1041-1048.
- **Yang, Y., Wang, Y., Yang, S., Liang, Z., Liu, G., Chen, Y. 2012**. A review: Thermophiles and their working mechanisms in degrading excess sludge. Journal of Applied Ecology, 23(7), 2026- 2030.

Z :

- **Zhang, M., Puri, A.K., Govender, A., Wang, Z., Singh, S., Permaul, K. 2015.** The multi-chitinolytic enzyme system of the compost-dwelling thermophilic fungus Thermomyces lanuginosus. Process Biochemistry, 50(2), 237-244.

Annexe 1 : Préparation des milieu

- **THERMUS THERMOPHILUS MEDUIM (TTM)**

Extrait de levure ……..……...……..4g

Proteose peptone ……..8g

Nacl……2g

L'eau distillé ……...1000ml

Agar …….28g

Adjusté PH à 7.0

- **THERMUS 162 MEDUIM (T162M)**

Extrait de levure ……..……...……..1g

Treptone……. ……..……..1g

Agar ……..……28g

Acide nitrilotriacetique…… 100mg

Caso4*2H 2O……40mg

Mgcl2*6 H2O…….200mg

Fe citrate …….. 0.5ml

Trace element solution ……0.5ml

Phosphate buffer……..100ml

L'eau distillé ……..900ml

Adjusté PH à 7.2 avec NaOH

- **THERMUS 162 MEDUIM MODIFIE (MT162M)**

Extrait de levure ……..……...……...…..2.5g

Treptone……. ……..……..2.5g

Agar ……..……28g

Acide nitrilotriacetique…… 100mg

CaSo4*2H 2O……40mg

MgCl2*6 H2O…….200mg

Fe citrate …….. 0.5ml

Trace element solution ……..…0.5ml

Phosphate buffer……..100ml

L'eau distillé …….....900ml

Adjusté PH à 7.2 avec NaOH

Annexe 2 : Solutions

- **l'eau physiologique**

Chlorure de sodium……9g
Eau distillée …….....1000ml

- **Phosphate Buffer**

KH2PO4……5.44g

Na2HPO4*12 H2O…….....43g

Eau distillé……1000ml

Adjusté PH à 7.2

- **Trace élement (TTM)**

H2SO4…….0.5ml

MnSO4* H2O …….2.28g

ZnSO4*7 H2O …….0.5g

H3BO3……..0.5g

CuSO4*5 H2O ……25mg

Na2Moo4* 2 H2O……25mg

CoCl2* 6 H2O……..45mg

Eau distillé……..1000ml

- **Trace élement (MT162M)**

Acide nitrilotriacetique……...12.8g

FeCl2* 4 H2O ……..……1g

MnCl2* 4 H2O …… ..0.5g

CoCl2* 4 H2O…….0.30g

H3BO3…….20mg

CuCl2*2 H2O ……..…50mg

Na2Moo4* 2 H2O……50mg

NiCl2* 6 H2O ……20mg

Eau distillé……..1000ml

Adjusté PH à 7.0 avec KOH

- **Rouge Congo à 0.1%**

Rouge Congo……..0.1g

Eau distillé…….....…...100ml

Annexe 3 : coloration de Gram

❖ Réactifs

- **Violet de gentiane**

Violet de gentiane…….....1g

Alcool éthylique à 95% …….....10ml

Phénol…….....2g

Eau distillée…….....100ml

- **Lugol de Gram**

Iodure de potassium ……..…….……..... 1g

Iode ……..…….1g

Eau distillée ……..……..…….300ml

- **Fuschine de ziehl**

Fuschine…….……...……..1g

Alcool éthylique à 95%.....10ml

Phénol ajoutés à 100ml d'eau distillée……..5g

❖ **Préparation du Frottis**

- Sur une lame de microscope, déposer une goutte d'H_2O.
- A l'aide d'une anse stérilisé (passant sous le bec benzène), toucher une colonie pour prélever des bactéries.
- Déposer ce prélèvement au milieu de lame, puis passer la lame dans la petite flamme du bec bunsen pour fixer à la chaleur.
- Déposer quelques gouttes de solution de violer de gentiane (cristal violer) sur le frottis fixé.
- Laisser agir 1 min, puis rincer à l'eau.
- Déposer quelques gouttes de lugol (un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries) sur le frottis, Laisser agir 1 min et rincer brièvement à l'H2O.
- Verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 s). Rincer avec l'eau. L'alcool pénètre dans la bactérie. La coloration au violet de Gentiane disparait. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.
- Contre-colorer en déposant la solution de safranine (rose) pendant 1 min. Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram- décolorées à l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram+.
- Laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope (grossissement 40x puis grossissement 100x avec une goutte d'huile à immersion).

Annexe 4 :Test de Catalase

❖ **Technique**

- Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur.

- Prélever une colonie à l'aide de l'anse.
- Dissocier la colonie dans la goutte.
- Observer immédiatement.

❖ **Lecture**

➢ Catalase positive : dégagement immédiat de bulles de gaz.

➢ Catalase négative : absence de dégagement de bulles de gaz.

Annexe 5 : Test d'oxydase

❖ **Technique**

- Placer un disque non imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée.
- Déposer une goutte de réactif sur le disque non imprégné.
- Avec une pipette Pasteur prélever une colonie et la déposer doucement sur le disque.

❖ **Lecture**

➢ Oxydase positive : virage de couleur rose-rouge.

➢ Oxydase négative : absence de couleur.

Annexe 6 : Tableau de Lecture et l'identification

Test	Groupements active	Réactions /Enzymes	Résultats	
			Négative	Positive
ONPG	Ortho-nitro-phényle-B-D-Galactopyranoside	Béta-galactosidase	Incolore	jaune
ADH	Arginine	Arginine déshydrolase	Jaune	Rouge
LDC ODC	Lysine Ornithine	Lysine décarboxylase Orthinedécarboxylase	Jaune Jaune	Orangé Rouge /orange
CIT	Sodium citrate	Utilisation de citrate	Vert	Bleu-vert/orange
H2S	Thiosulfate de sodium	Production de H 2S	Incolore	Noir
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orange
TDA	Tryptophane	Tryptophane	Jaune	Marron

		désaminase		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Incolore	Rose
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoine	VP1+VP2	
			Incolore	Rose /rouge
GEL	Gélatine emprisonnant de charbon	Gélatinase	Pas de diffusion de pigment	Diffusion de pigment noir
GLU	Glucose	Glucose Fermentation /oxydation	Bleu /bleu vert	Jaune
MAN	Mannitol	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu vert	Jaune
SAC	Sucrose	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu vert	Jaune
MEL	Mlebiose	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu vert	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu vert	Jaune
NO 3-NO2	GLU tube	Production de NO2 réduction au stade N2.	Jaune	Rouge
			NIT 1+NIT 2, 2-3 min.	



Annexes


I17'


ONPG ADH
IGELI GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA
I18


23
api 20E
ONPG ADH ODC ODC
IGELI GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY


api 20E
IGELI GLU MAN INO SOR RHA AMY

Annexes


W7
api 20 E
ONPG
IND
VP
GEL
GLU
MAN
INO
SAC
AMY


W10
api 20 E
ONPG
ADH
LAC
GLU
MAN
INO
SOR
RHA
SAC
ARA


W
15
api 20 E
ONPG
ADH
TDA
IND
GEL
GLU
MAN
ARA


H7
H7
api 20 E
ONPG
TDA
IND
GEL
GLU
MAN
INO
SOR
RHA
SAC
MEL
AMY
ARA







Annexe 3 : Milieux pour les tests enzymatiques

- **Gélose à l'amidon**

TTM……...l00 ml

Amidon ……01 g

- **Gélose au lait**

Poudre de lait ……...….05 g

Eau distillée …….....50 ml

Agar……02 g

Stériliser à l'autoclave 15min à 115 °C.

- **Milieu CMC**

CMC ……..……..……..… 20g

Extrait de levure……...…..……...5g

Agar ……..……..15g

Eau distillé…….....1000ml

pH=5

- **Milieu de base contenant 1% (v/v) de ou de Tween 80**

TTM……....100ml

Tween 80…….....1ml

- **Milieu de base contenant 1% (v/v) de ou de Tween 20**

TTM……....100ml

Tween 20…….....1ml

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

Milieu TTM……...90ml

Emulision de Jaune d'oeuf…….10ml

- **Milieu Pectine**

NaCl…….0.1g

CaCl2* 2H2O…...……..0.04g

MgSO4 * 7H20…….…….0.05g

Pectine…….……..1g

Extrait de levure…….…….……0.2g

Peptone…….…….0.4g

Agar ……..……..……..……..3g

Eau distillée……...100ml

Résultat de l'activité enzymatique

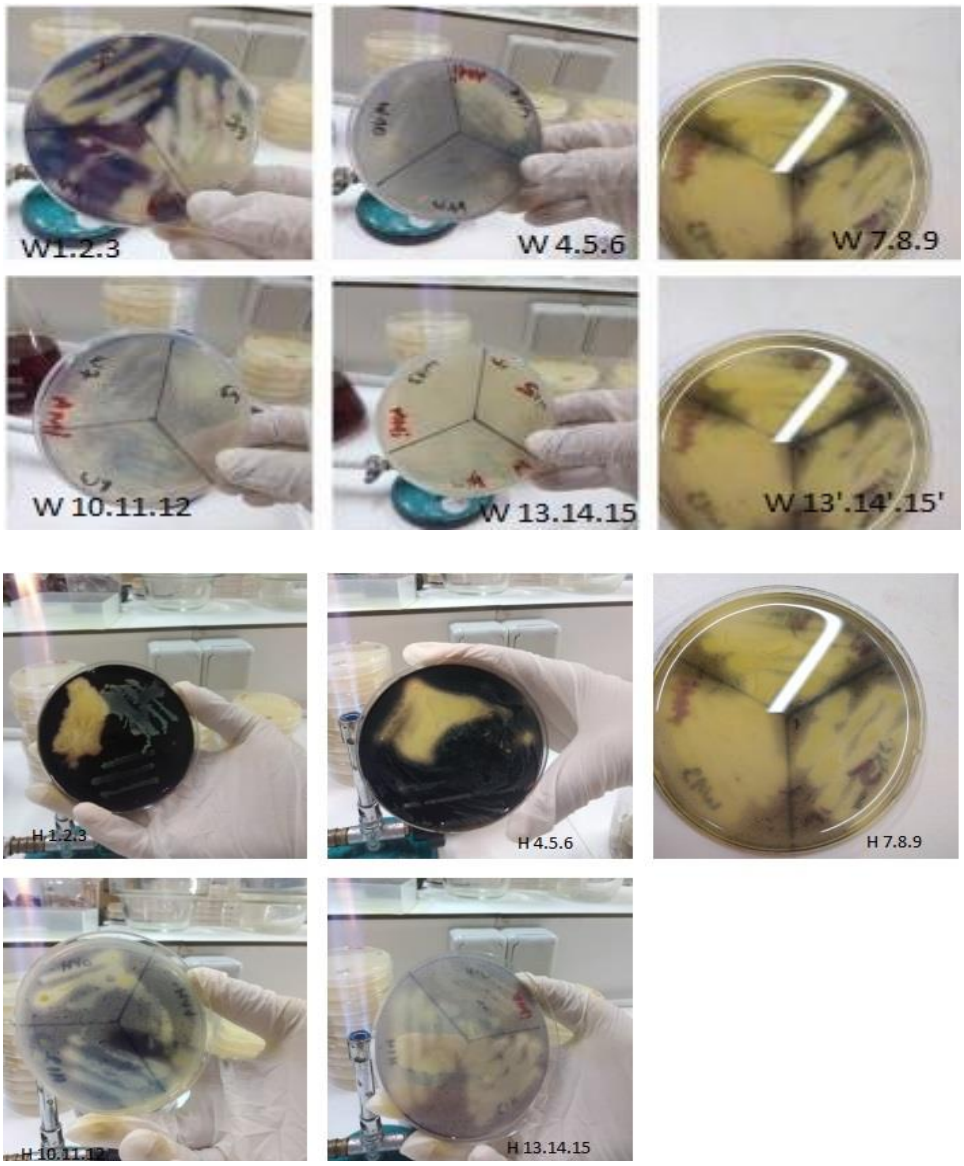
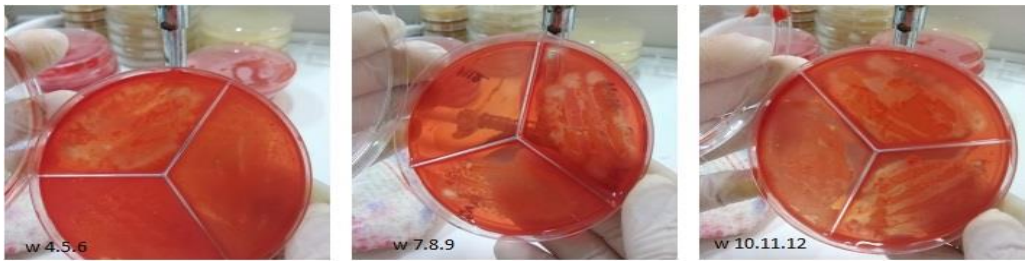


Figure (23) : les résultats de l'amidon



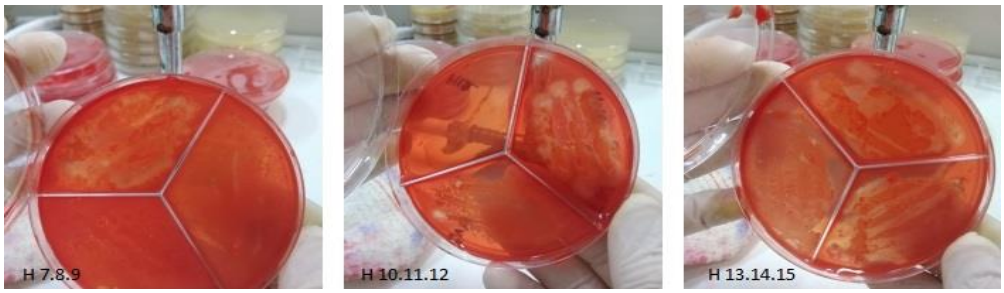


Figure (24) : les résultats de CMC

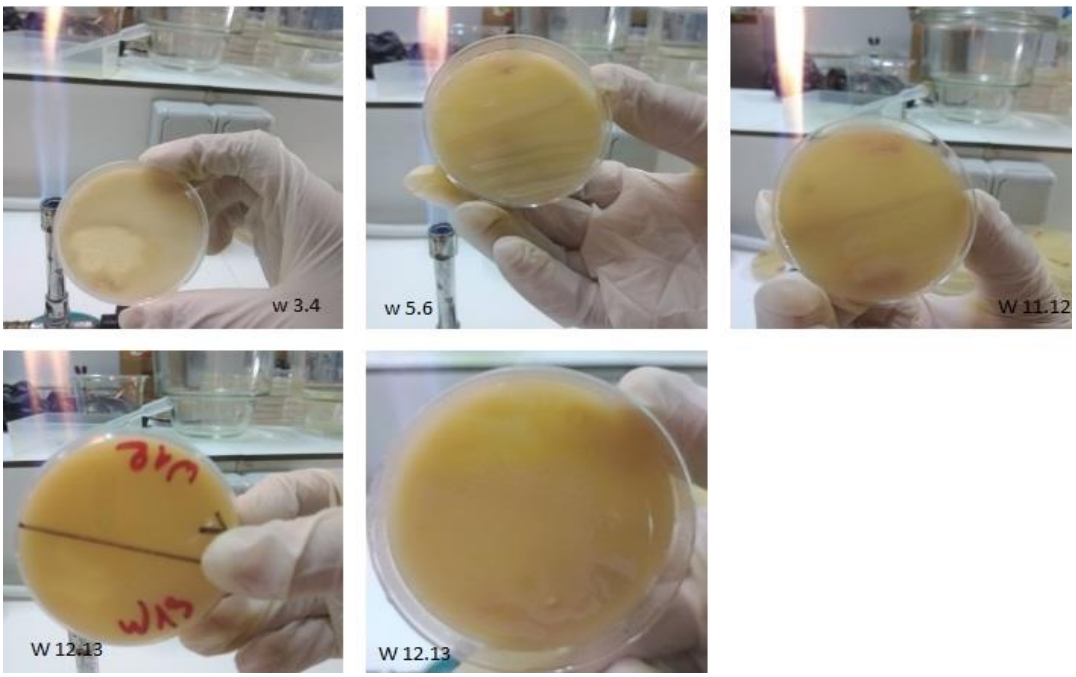
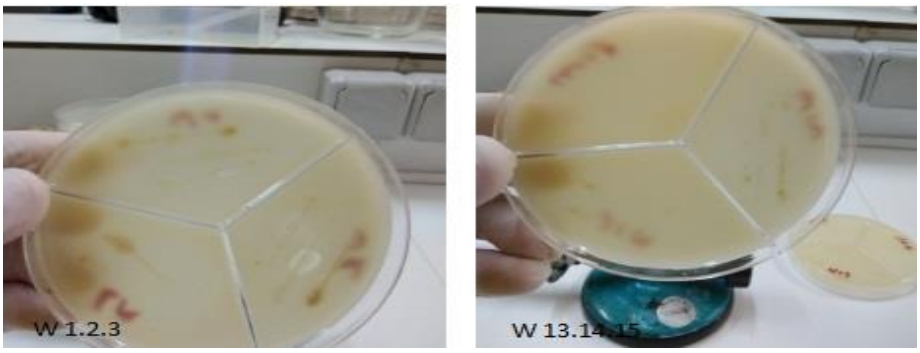


Figure (25) : les résultats de lait écremé



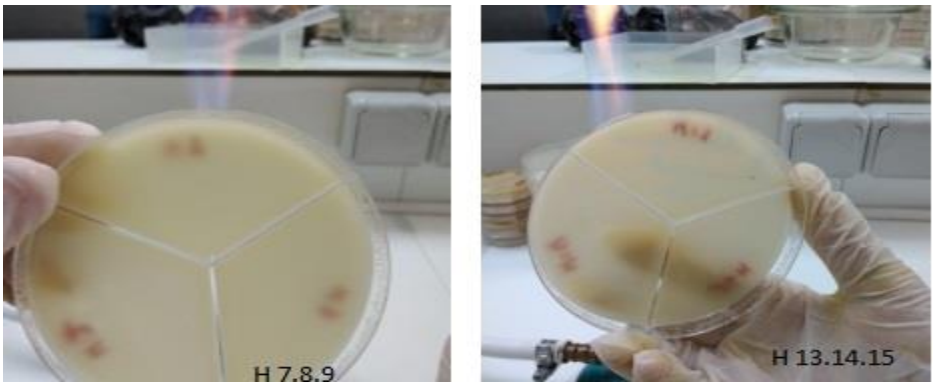


Figure (26) : les résultats de Jaune d'œuf

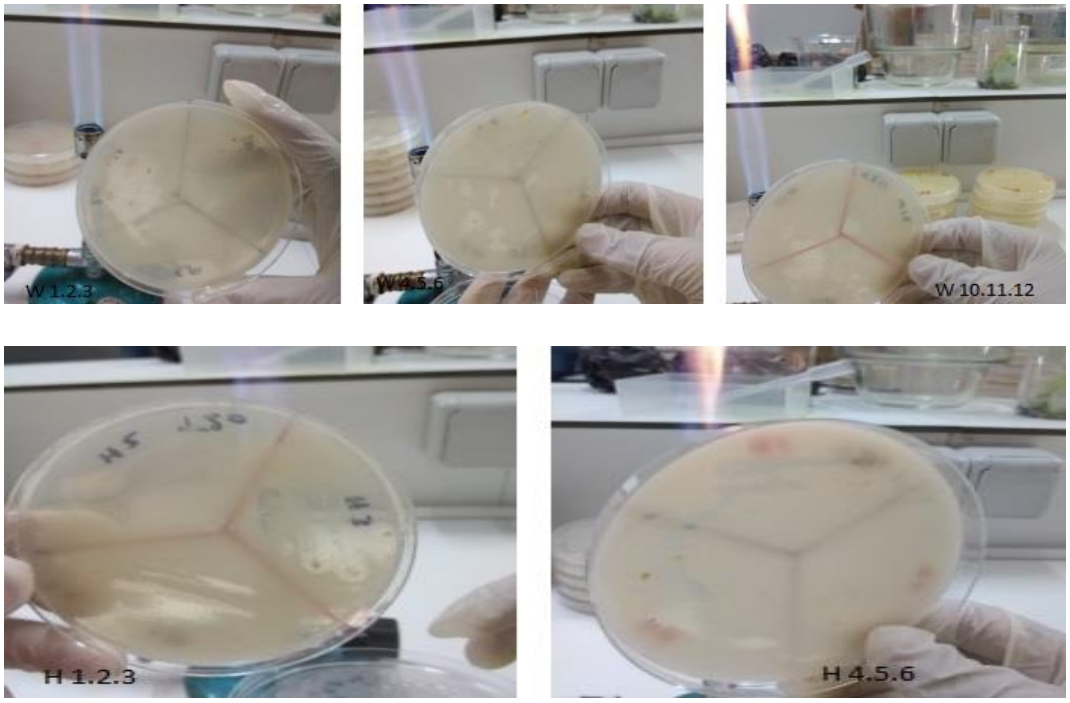


Figure (27) : les résultats de T 20 et T 80

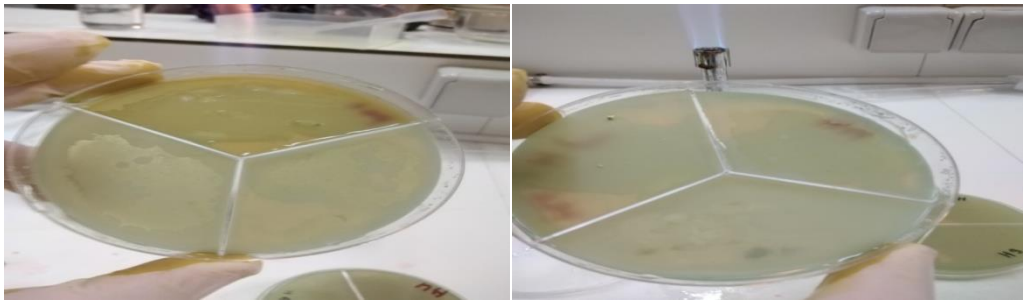


Figure (28) : les résultats de Pectine

Annexe 8 : Appareillage



Vortex



Micropipette



Agitateur



Balance



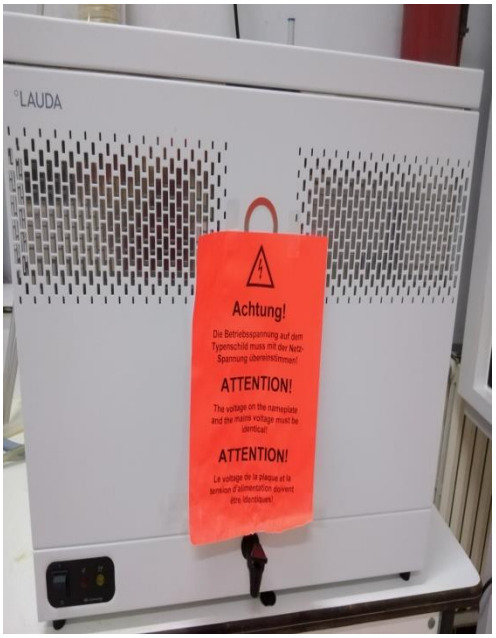
Bec bunsen



Microscope Optique



PH mètre



Distillateur



Autoclave (stérilisateur)



Incubateur



Etuve



Bain mari



Réfrigérateur



Congélateur