

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

Faculté des Sciences
Département de Microbiologie et
Biochimie
N° :



DOMAINE : Sciences de la nature et de la vie
FILIERE : Sciences Biologiques
OPTION : Microbiologie Appliquée

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par :

AISSAT Ibtissam & MEKKI Nadjat

Intitulé :

Isolement et caractérisation de bactéries de la source naturelle de
Hammam Guergour (Nord de Sétif-Algérie)

Soutenu devant le jury composé de :

Président	FREIDJA M.L.	MCB	Université de M'sila
Encadreur	BENSEMANE L.	MCB	Université de M'sila
Examineur	BENKHALED A.	MCB	Université de M'sila

Année universitaire : 2018 /2019

Remerciements

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

*Tout d'abord, nous tenons à remercier Madame **BENSEMANE Latifa** pour nous avoir donné la chance de travailler sous sa direction, pour sa confiance en nous et ses encouragements mais surtout pour sa générosité dans le travail, qu'elle trouve en ces mots toute notre gratitude.*

Nos chaleureux remerciements sont adressés aux membres de Jury qui ont pris sur leur temps et ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail :

*Ms **BENKHALED A.Rahim** qui nous a fait l'honneur de présider ce Jury*

*Et Ms **FREIDJA Mohamed** qui a bien voulu examiner ce travail.*

*Nos sincères remerciements à toutes les personnes qui travaillent au laboratoire d'ADE, au sieur **SEGHIRI Kamel** et toutes personnes qui nous ont aidé, conseillé, orienté et encouragé tout au long de la genèse de ce mémoire.*

Ibtissam et Nadjat

Dédicace

**A mes chers parents*

Certes, on ne choisit pas ses parents mais s'il fallait le faire, je vous aurais choisi, vous avez su me montrer le bon exemple à travers votre sérénité, votre grande patience et sans oublier vos efforts inlassables pour ma réussite.

Trouvez ici l'expression de toute ma reconnaissance, de mon amour et de mon profond respect.

A ma famille qui m'a toujours soutenu **Salim, Boudjema et **Wanissa**. Clin d'oeil particulier à mes chères cousines **Saadia** et **Luiza**.*

A ma puce **Nadjat pour sa fidélité, sa tendresse, son impertinence et ses pensées 'géniales' quotidiennes !*

**A tous mes amis.*

** A tous les étudiants de microbiologie promotion 2018/2019.*

Ibtissam

Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels soient les termes embrassés, je n'arriverai jamais à leur exprimer mon amour sincère.

**A l'homme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon cher papa ;*

**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 mes frères : **Farid, Nacer et **Aziz**. Aussi mes très chères sœurs, **Saadia Souaad** et **Samia** pour leur indéfectible soutien et leur amour infini.*

A mes très chers ami(e)s surtout **Aicha, Didi, Douaa, Fatima et **Hafidha** qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours ;*

** A mes chers **Aboubaker** et **Imad** pour leur aide et leur soutien que dieu vous protège et vous préserve ;*

Sans oublier ma copine **Ibtissam pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce travail et nos études*

Nadjat

Liste des abréviations

ABIS:	Automated Biometric Identification System
BN:	Boullion nutritif
Cit:	Citrate
Glu:	Glucose
GN:	Gélose nutritive
Lac:	Lactose
LDC:	Lysine Décarboxylase
Man:	Mannitol
MFC:	Microbaial Fuel Cells
PCR:	Polymerase Chain Reaction
T opt:	Température optimale
TSI:	Triple Sugar Iron
V/V:	volume par volume

Liste des figures

Figure 1 : Relation vis-à-vis de la température d'organismes psychrophiles, mésophiles, thermophiles, et de différents hyperthermophiles	3
Figure 2 : Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative de séquences de gènes ribosomiques	4
Figure 3 : source chaude localisée dans le Parc national de Yellowstone, fumeurs noirs, dorsale pacifique.....	6
Figure 4 : localisation de « Hammam Guergour » sur la carte	13
Figure 5 : cultures des différentes souches sur GN	20
Figure 6 : Observation au microscope photonique (x100)	22
Figure 7 : Cinétique de croissance des souches isolées à plusieurs températures	23
Figure 8 : Exemples d'activités hydrolytiques	25

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques exemples de la diversité métabolique des thermophiles	8
Tableau 2 : l'aspect macroscopique des isolats	21
Tableau 3 : Caractérisation cellulaire des isolats	22
Tableau 4 : Caractérisation biochimique des isolats	24
Tableau 5 : Résultats des activités hydrolytiques	26
Tableau 6 : Résultats d'identification biométrique des isolats	27

Résumé

En Algérie, peu d'études des sources thermales et des thermophiles ont été réalisées. Les bactéries thermophiles, quoiqu'elles constituent un groupe important de micro-organismes en raison de leur capacité à produire des enzymes d'intérêt industriel. Dans cette étude, des bactéries thermophiles ont été isolées de l'eau thermale de Hammam Guergour-Sétif. Dix souches ont été purifiées et caractérisées en utilisant des approches phénotypiques, physiologiques et biochimiques. Les résultats ont montré la présence de deux genres *Bacillus* et *Brevibacillus* avec dominance du genre *Bacillus*, et un autre dont les tests effectués sont insuffisants pour son identification. Toutes les bactéries ont montré une excellente activité enzymatique extracellulaire. En effet, *Bacillus sp* pourrait être une source de divers enzymes thermostables.

Les mots clés : sources thermales, thermophiles, *Bacillus*, *Brevibacillus*, activité enzymatique extracellulaire, enzymes thermostables.

Abstract

In Algeria, not much of study of hot springs and Thermophiles have been done. Thermophilic bacteria are less studied but are important group of microorganisms due to their ability to produce industrially important enzymes. In this study, thermophilic bacteria were isolated from hot water of Hammam Guergour-Setif. Ten strains were purified and characterized by using phenotypic and biochemistry methods. Results showed the presence of two genera *Bacillus* and *Brevibacillus* with dominance of *Bacillus*, and another one such tests are insufficient for its identification . In addition, they exhibited considerable amount of extracellular enzyme activity. *Bacillus sp* could be a source of various thermostable enzymes.

Key words: hot springs, Thermophiles, *Bacillus*, *Brevibacillus*, extracellular enzymatic activity, thermostable enzymes.

ملخص:

في الجزائر لا توجد دراسات كثيرة حول الينابيع الحارة والمركبات الحرارية. البكتيريا المحبة للحرارة أقل دراسة ولكنها تشكل مجموعة مهمة من الكائنات الحية الدقيقة بسبب قدرتها على إنتاج إنزيمات ذات أهمية صناعية. خلال هذه الدراسة تم عزل البكتيريا المحبة للحرارة من مياه حمام فرفور الحارة بسطيف. تم انتقاء عشر سلالات ودراسة خصائصها باستخدام مناهج ظاهرية، فيزيولوجية، وكميحية. أظهرت النتائج وجود جنسين من البكتيريا هما *Bacillus* و *Brevibacillus* مع هيمنة *Bacillus*، و جنس آخر حيث أن هذه الاختبارات غير كافية لتحديد هويته. كما أنها أظهرت وجود نشاط انزيمي خارج خلوي كبير يمكن أن تكون مصدرا لمختلف الإنزيمات المقاومة للحرارة.

الكلمات المفتاحية: الينابيع الحارة، البكتيريا المحبة للحرارة، *Bacillus*، *Brevibacillus*، نشاط انزيمي خارج خلوي، إنزيمات مقاومة للحرارة.

Table des matières

LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES ABREVIATIONS	
RESUME	
INTRODUCTION	1
Chapitre I: Revue bibliographique	
I.1 La Thermophilie	3
I.2 Phylogénie des thermophiles.....	4
I.3 Niches écologiques des bactéries thermophiles	4
I.3.1 Biotopes naturels	5
I.3.1.1 Biotopes terrestres	5
I.3.1.2 Biotopes marins	5
I.3.2 Biotopes artificiels	6
I.4 Diversité taxonomique et métabolique des thermophiles	6
I.4.1 Bactéries thermophiles hétérotrophes	6
I.4.2 Bactéries thermophiles phototrophs	7
I.4.3 Bactéries thermophiles chimiolithoautotrophes	7
I.5 Adaptations physiologiques à la thermophilie	8
I.5.1 Les protéines	8
I.5.2 Les lipides	9
I.5.3 Les acides nucléiques	9
I.6 Application des bactéries thermophiles dans la biotechnologie	10
I.6.1 Applications basées sur les biomolécules	10
I.6.1.1 Enzymes	10
I.6.1.2 Biopolymères	11
I.6.2 Applications basées sur cellules entières	12
Chapitre II : Matériel et méthodes	
II.1 Site d'étude et échantillonnage	13
II.2 Isolement, purification et conservation des isolats	14
II.2.1 Isolement	14
II.2.2 Purification	14
II.2.3 Conservation des isolats	14

II.3 Identification des isolats	14
II.3.1 Caractérisation morphologique et culturale des isolats	14
II.3.1.1 Examen macroscopique	14
II.3.1.2 Examen microscopique	14
II.3.2 Caractérisation physiologique des isolats (Température de croissance et thermotolérance)	15
II.3.3 Caractérisation biochimique des isolats	15
II.3.3.1 Test de catalase	15
II.3.3.2 Test d'oxydase	15
II.3.3.3 Test de lysine-décarboxylase	15
II.3.3.4 Recherche d'uréase	16
II.3.3.5 Recherche de tryptophanase	16
II.3.3.6 Utilisation du citrate	16
II.3.3.7 Utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron	16
II.3.3.8 Test mannitol-mobilité	17
II.3.3.9 Test de type respiratoire	17
II.4 Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires	17
II.4.1 Hydrolyse de l'amidon	17
II.4.2 Hydrolyse de la caséine	18
II.4.3 Hydrolyse du Tween 80	18

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1 Analyse physico-chimique de l'eau thermale de Hammam Guergour-Sétif ...	19
III.2 Isolement et purification des isolats	19
III.3 caractérisation phénotypique	21
III.3.1 Observation macroscopique	21
III.3.2 Observation microscopique	21
III.4 Température de croissance	23
III.5 Caractérisation biochimique	24
III.6 La mise en évidence des enzymes hydrolytiques extracellulaires	25
CONCLUSION	28

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Introduction

Introduction

Les micro-organismes habitent tout environnement pouvant leur offrir des conditions idéales pour leur croissance et leur reproduction mais, compte tenu de leurs degrés d'adaptabilité, ils peuvent se trouver même dans des environnements extrêmes (**Schlegel et al., 2006**).

La température est l'un des paramètres de l'environnement les plus importants, si ce n'est pas le plus important, vis-à-vis de l'impact sur la croissance et la survie des micro-organismes. Si la température est trop basse ou trop élevée, les micro-organismes ne se développeront pas. Néanmoins, selon les micro-organismes et leur habitat d'origine, ces températures minimales et maximales varient énormément. La vie microbienne est très abondante dans des environnements où la température est élevée, y compris dans l'eau bouillante. Au-delà de 65 °C environ, où seule la vie procaryote existe, il existe une grande diversité de Bacteria et d'Archaea (**Madigan et Martinko, 2007**).

A la fin des années soixante, le microbiologiste américain **Thomas Brock** a montré que des populations microbiennes abondantes prolifèrent dans les sources chaudes du Parc National de Yellowstone aux Etats-Unis, à des températures comprises entre 50 °C et 90 °C. Cette découverte allait ouvrir la voie à une nouvelle ère passionnante de la microbiologie. Désormais tous les milieux extrêmes de la planète allaient être l'objet de nombreuses investigations destinées tant à répertorier les microorganismes capables d'y proliférer, qu'à repousser les limites de la vie sur terre (**Guezennec, 2004**).

Les bactéries thermophiles sont des microbes 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 et plusieurs nouveaux genres et espèces thermophiles ont été récemment décrites en raison de leur capacité à produire des molécules d'intérêt biotechnologique (**Aanniz et al., 2015**).

De nombreux tests biochimiques ont été introduits dans le but d'évaluer les activités enzymatiques des bactéries thermophiles et leur identification. Plusieurs chercheurs souhaitent l'explorer de manière intensive afin d'isoler de nombreuses enzymes thermostables, qui ne se limitent pas à ADN polymérase, lipase, et protéase, ...etc. Des

recherches sont en cours pour déterminer leur potentiel à produire plusieurs nouveaux produits importants sur le plan biotechnologique (Nshimiyimana *et al.*, 2018).

Notre étude consiste à isoler des bactéries thermophiles à partir d'une source chaude alimentant la station thermale Hammam Guergour -Sétif. A cet égard le mémoire présente deux volets :

- Le premier volet se limite à la caractérisation et l'identification des souches bactériennes isolées ;
- Le deuxième volet vise à rechercher les enzymes extracellulaires produites par ces bactéries thermophiles.

Ce travail est organisé en trois chapitres :

- Le premier abordant la grande diversité des populations microbiennes thermophiles en particulier celles appartenant au domaine Bacteria issus de différents écosystèmes consistant à montrer leur place dans la biotechnologie ;
- Le deuxième s'intéresse à l'exploration de l'ensemble des expériences faites regroupant le matériel et les différents procédés méthodologiques ;
- Le troisième abordant les résultats et la discussion suivie d'une conclusion. A la lumière des résultats obtenus, nous essaierons de proposer quelques perspectives de recherche.

Chapitre I :
Revue bibliographique

I.1 La thermophilie

La relation des organismes vivants à la température a longtemps été considérée en biologie comme un élément de base de classification. Quatre groupes majeurs sont définis selon les températures optimales de croissance : les psychrophiles qui ont une T_{opt} de croissance basse, les mésophiles ayant une T_{opt} moyenne, les thermophiles ayant une T_{opt} élevée et les hyperthermophiles ayant une T_{opt} très élevée (Figure 1).

Les organismes thermophiles (du grec *thermê*, chaleur et *philein*, aimer) sont des organismes ayant besoin d'une température élevée pour se développer. 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 la 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 deux sous catégories au sein des thermophiles :

- Les thermophiles dont la température de croissance se situe au-delà de 45 °C ;
- Les hyper-thermophiles dont la T_{opt} de croissance est au-delà de 80 °C (**Madigan et Martinko, 2007 ; Alain et al., 2010**).

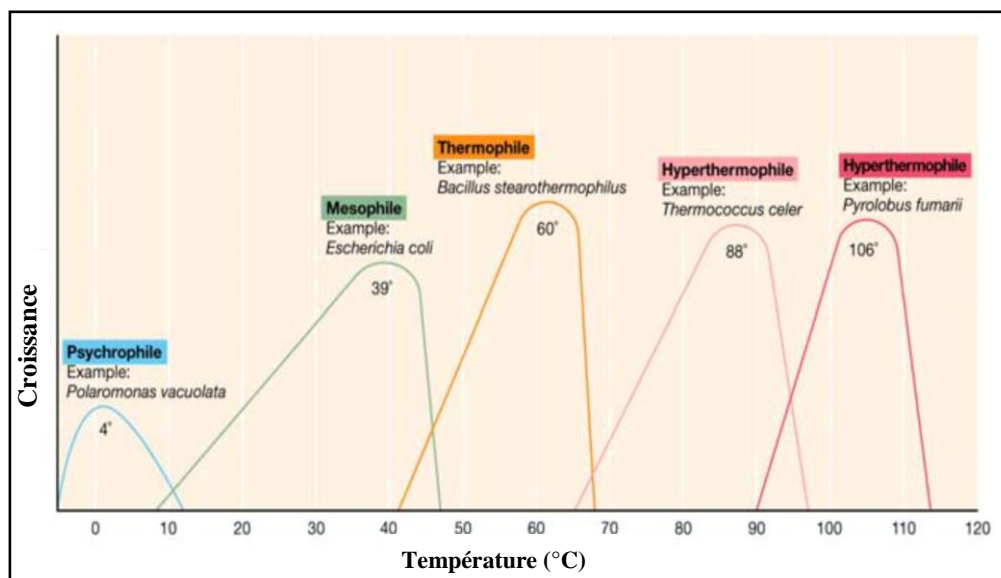


Figure 1 : Relation vis-à-vis de la température d'organismes psychrophiles, mésophiles, thermophiles, et de différents hyperthermophiles. Les températures optimales des différents organismes cités en exemple sont indiquées sur les courbes. Les hyperthermophiles ont des températures optimales supérieures à 80 °C (**Madigan et Martinko, 2007**).

I.2 Phylogénie des thermophiles

Les études phylogénétiques basées sur l'analyse de l'ARN ribosomal 16S ont permis de mettre en évidence l'existence de trois domaines distincts : les bactéries (ou *Bacteria*), les Archées (*Archaea*) et les eucaryotes (*Eukarya*). Cette division a été confirmée par les résultats de la génomique (Querellou et Guezennec, 2010). Les microorganismes thermophiles sont présents dans les branches les plus profondes de l'arbre du vivant tel qu'il a été proposé par Woese. Ils se situent près du dernier ancêtre commun ou progénote à partir duquel trois lignées ont divergé, correspondant aux trois domaines. Ceci a conduit à l'hypothèse selon laquelle la vie aurait émergé d'environnements chauds (Figure 2) (Postec, 2005).

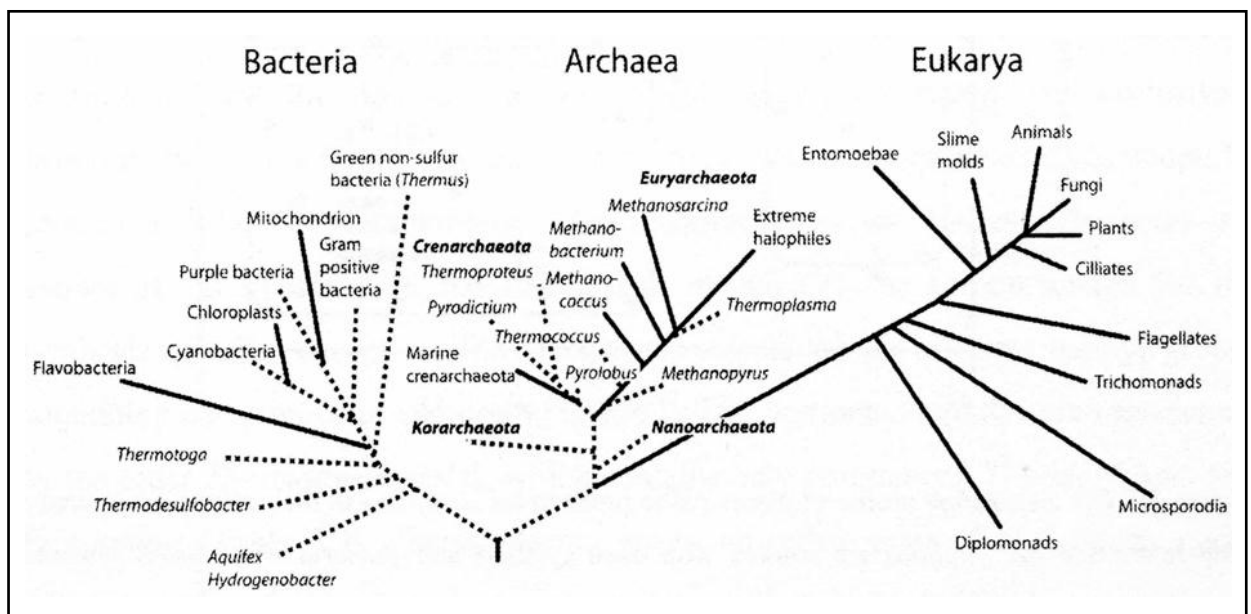


Figure 2 : Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative de séquences de gènes ribosomiques. Ces données soutiennent la discrimination entre les trois domaines, deux d'entre eux contenant des représentants procaryotes (*Bacteria* et *Archaea*). L'enracinement représente la position supposée du dernier ancêtre commun universel. Les groupes phylogénétiques contenant des membres thermophiles ou exclusivement thermophiles sont indiqués en lignes pointillées (d'après Madigan *et al.* (2003), cité par Postec, 2005).

I.3 Niches écologiques des thermophiles

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.

I.3.1 Biotopes naturels

I.3.1.1 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 (Ferrera et Reysenbach, 2007).

La nature de l'eau va dépendre des roches traversées et elle est généralement associée à une activité volcanique, la température de l'eau *in situ* sera fonction de la profondeur d'origine pour atteindre des températures inférieures à 100 °C et des pH acides ou basiques à la surface de la terre c'est le cas des sources chaudes localisées en Islande, en Algérie ou encore dans le Parc national de Yellowstone (Figure 3.a) (Gregoire et al., 2009).

Certaines sources chaudes présentent des variations de températures, alors que d'autres sont très stables, avec des écarts de 1 ou 2 °C au maximum, sur plusieurs années. De plus, des sources différentes peuvent avoir des compositions chimiques et des pH très variés. Quel que soit leur composition, ces sources contiennent généralement suffisamment d'éléments nutritifs pour permettre le développement de populations, souvent abondantes, de chimio-organotrophes et chimiolithotrophes hyperthermophiles (Madigan et Martinko, 2007).

I.3.1.2 Biotopes marins

L'eau de mer s'infiltré 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 H_2S , CH_4 , NH_4^+ 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 (Figure 3.b) (Minic et al., 2006).

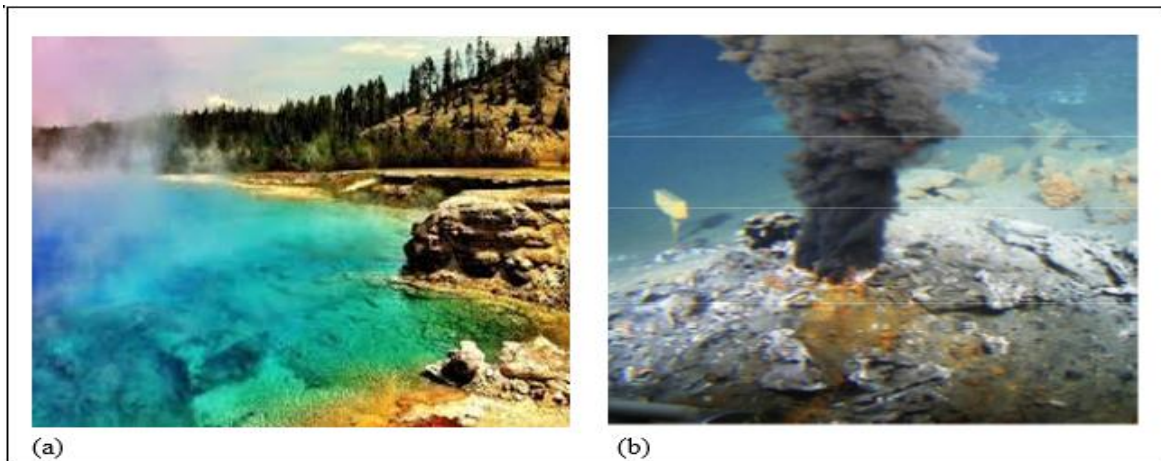


Figure 3 : (a) source chaude localisée dans le Parc national de Yellowstone (**Guide voyage du Parc Yellowstone**) ; (b) fumeurs noirs, dorsale pacifique (**Minic et al., 2006**).

I.3.2 Biotopes artificielles

Les thermophiles habitent également 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.

I.4 Diversité taxonomique et métabolique des bactéries thermophiles

Les thermophiles sont présents dans les trois domaines de la vie : Bacteria, Archaea et Eukarya. Ils sont métaboliquement divers et incluent des phototrophes, des chimiotrophes, des autotrophes et des hétérotrophes (Tableau 1). Les micro-organismes thermophiles du domaine *Bacteria* possèdent des caractéristiques physiologiques et métaboliques très diverses incluent des phototrophes, des chimiolithotrophes, des autotrophes et des hétérotrophes.

I.4.1 Les bactéries thermophiles hétérotrophes

La plupart des bactéries thermophiles isolées sont des hétérotrophes. Parmi ceux-ci, un seul groupe peut être défini comme hyperthermophile : les *Thermotogales*, ces thermophiles sont entourés d'une gaine "une toge" qui entoure la cellule. *Thermotoga* a été isolé à partir des événements hydrothermaux, des sources terrestres et des puits de pétrole. *Thermotoga spp* sont fermentaires et se développent mieux en anaérobiose lors de l'utilisation de thiosulfate comme accepteur d'électrons. Un autre groupe d'hétérotrophes obligatoires est les *Thermales* où *Thermus aquaticus* a été la première isolée d'une source thermale alcaline dans le Parc National de Yellowstone.

Un grand nombre d'isolats thermophiles sont des bactéries à Gram positif appartenant à l'ordre de *Bacillales* et de *Clostridiales*, dont beaucoup forment des spores résistantes à la chaleur et jouent un rôle clé dans la dégradation de la matière organique dans la plupart des environnements à température modérée. Souvent ces bactéries se développent dans des conditions extrêmes autres que les températures élevées telles que la forte acidité ou alcalinité, et sont métaboliquement très diverses.

La plupart des isolats utilisent la matière organique comme donneur et accepteur d'électrons telles que *Bacillus vulcani* et *Clostridium fervidus*, mais certaines espèces utilisent des composés inorganiques comme accepteur d'électrons, *Thermoterrabacterium ferrireducens* réduit le fer ferrique, *Ammonifex degensii* utilisent des nitrates, sulfates et du soufre élémentaire.

Des représentants de la classe des *Deltaproteobacteria* ont été également isolés d'écosystèmes thermiques, Ce sont des sulfato-réductrices qui utilisent des composés organiques comme donneurs d'électrons (*Desulfacinum hydrothermale*, *Thermodesulforhabdus norvegicus*).

I.4.2 Les bactéries thermophiles phototrophes

On retrouve essentiellement les cyanobactéries qui effectuent la photosynthèse oxygénée, elles se trouvent dans les milieux chauds aux températures relativement hautes. *Synechococcus lividus* forme des tapis microbiens épais à des températures comprises entre 60 et 74 °C coexistant souvent avec des phototrophes anaérobies telles que *Chloroflexus*. Il s'agit d'une bactérie filamenteuse montre une motilité glissante et contient des vésicules à pigment appelées chlorosomes. Ainsi des photo-autotrophes anaérobies se trouvent dans les sources thermales, tels que les bactéries pourpre sulfureuses (Proteobacteria) et vertes sulfureuses (*Chlorobi*). Dans les environnements thermiques contenant de sulfure, ces organismes oxydent le sulfure en soufre qui s'accumule à l'intérieur (Proteobacteria) ou à l'extérieur (*Chlorobi*) de la cellule, puis oxydé en sulfate (Ferrera et Reysenbach, 2007).

I.4.3 Les bactéries thermophiles chimiolithoautotrophes

Certaines bactéries sont capables de fixer le dioxyde de carbone en utilisant de l'énergie chimique (chimiolitho-autotrophie). La plupart des bactéries isolées à partir des événements hydrothermaux appartiennent aux *Epsilonproteobacteria*, aux *Thermales*, aux *Thermotogales* et aux *Aquificales*. Les bactéries de l'ordre *Aquificales* utilisent l'hydrogène, le soufre et le thiosulfate comme donneurs d'électrons et l'oxygène et/ou les nitrates comme accepteurs

d'électrons. Quelques membres de cet ordre peuvent également croître sur des composés organiques. On retrouve également dans ces catégories de bactéries les *Thiotrix* et *Thiobacillus* qui oxydent les sulfures, ce sont des petits bacilles à Gram négatif, certains peuvent se développer à des pH très acides, d'autres à des températures élevées (Capdepuy et Canellas, 1995 ; Ferrera et Reysenbach, 2007).

Tableau 1. Quelques exemples de la diversité métabolique des thermophiles.

Processus	Source d'énergie	Source de carbone	Donneur d'électrons	Accepteur d'électrons	Exemples
Photosynthèse anoxygénique	Lumière	CO_2	H_2S , S , $S_2O_3^{2-}$	CO_2	<i>Thermochromatium</i> , <i>Chloroflexus</i>
Photosynthèse oxygénique	Lumière	CO_2	H_2O	CO_2	Algues et cyanobactéries, <i>Cyanidium</i> , <i>Synechococcus</i>
Oxydation du soufre	Chimique	CO_2	H_2S , S , $S_2O_3^{2-}$	O_2 , NO_3^-	<i>Aquificales</i> , certaines Epsilonproteobactéries
Oxydation du fer	Chimique	CO_2	Fe^{2+}	NO_3^-	<i>Ferroglobus</i>
Réduction du fer	Chimique	CO_2	H_2	Fe^{3+}	<i>Pyrobaculum</i> , <i>Pyrodictium</i> , <i>Thermotoga</i>
Oxydation organique	Chimique	Organique	$[CH_2O]_n$	O_2	Moisissures, <i>Thermus</i> , <i>Thermoplasma</i> , <i>Rhodothermus</i> , <i>Picrophilu</i>
Oxydation de l'hydrogène	Chimique	CO_2	H_2	O_2 , S	<i>Aquificales</i> , certaines Epsilonproteobactéries
Dénitrification	Chimique	CO_2	H_2	NO_3^-	<i>Aquifex</i> , <i>Persephonella</i> , <i>Ammonifex</i> , <i>Ferroglobus</i> , <i>Pyrobaculum</i> , <i>Pyrolobus</i>
Réduction du soufre	Chimique	Organique/ CO_2	H_2 , $[CH_2O]_n$	CO_2	<i>Thermococcales</i>
Réduction des sulfates	Chimique	Organique/ CO_2	H_2 , $[CH_2O]_n$	SO_4	Certaines Deltaproteobactéries, <i>Archaeoglobus</i>
Fermentation	Chimique	Organique	H , $[CH_2O]_n$	$[CH_2O]_n$	Moisissures, <i>Bacillus</i> , Clostridia

I.5 Adaptations physiologiques à la thermophilie

La vie à haute température est rendue possible par un certain nombre de mécanismes adaptatifs et/ou de molécules que l'on retrouve uniquement chez les thermophiles. Analyse de biomolécules importantes chez les bactéries thermophiles a révélé des différences structurales subtiles dans les protéines, les acides nucléiques et lipides (Alain et al., 2010).

I.5.1 Les protéines

Les protéines des thermophiles et hyperthermophiles sont plus thermostables que celles de leurs homologues mésophiles et fonctionnent de manière optimale à haute température.

Néanmoins, il n'existe aucune règle générale permettant d'expliquer cette thermostabilité, chaque protéine adoptant sa propre stratégie de stabilisation. Cette thermostabilité intrinsèque des protéines en général et des enzymes en particulier est le plus souvent due à des modifications mineures de la séquence en acides aminés favorisant le repliement de la protéine sous une forme compacte avec un nombre réduit de cavités internes, un nombre élevé de ponts ioniques contribuant à maintenir l'ensemble et à résister à la dénaturation. La synthèse en grandes quantités de solutés osmocompatibles contribue également à protéger les protéines d'une dégradation thermique.

I.5.2 Les lipides

Les membranes cytoplasmiques des microorganismes thermophiles possèdent une structure particulière leur permettant de rester stables et fonctionnelles aux températures élevées. Celles des bactéries (hyper)thermophiles sont composées d'une bicouche lipidique formée d'acides gras liés à un glycérol par une liaison ester et sont exceptionnellement riches en acides gras saturés, cette richesse en acides gras saturés permet d'augmenter la température de fusion de la membrane tout en maintenant une stabilité et une fluidité optimales dans des conditions de thermophilie (**Alain et al., 2010**).

I.5.3 Les acides nucléiques

On pense qu'une protéine uniquement présente chez les espèces hyperthermophiles pourrait être responsable de l'absence de dénaturation de l'ADN chez les procaryotes. Tous les hyperthermophiles produisent une ADN topoisomérase appelée ADN gyrase reverse. Cette topoisomérase provoque la formation de surenroulement positif de l'ADN au contraire des ADN gyrases présentes chez tous les procaryotes non thermophiles qui provoquent la formation d'un surenroulement négatif, autre mécanisme fait intervenir une augmentation des composés cellulaires solubles capables d'empêcher les lésions chimiques de l'ADN tels que 2,3diphosphoglycérate de potassium cyclique présente en concentrations élevées chez *Methanopyrus*. En plus des sels et de l'ADN gyrase reverse, d'autres protéines des hyperthermophiles peuvent intervenir dans le maintien de l'intégrité de la double hélice d'ADN. Par exemple, une petite protéine thermostable appelée *Sac7d*, présente chez *Sulfolobus*, se fixe dans le petit sillon de l'ADN de façon non spécifique et augmente ainsi la température de dénaturation de l'ADN en augmentant fortement la formation de boucles dans la molécule d'ADN (**Madigan et Martinko, 2007**).

I.6 Applications biotechnologiques des bactéries thermophiles

On peut distinguer deux types d'applications différentes. La première repose sur l'utilisation directe des organismes. C'est le cas en particulier pour les applications liées à la bioremédiation et à la biolixiviation. Le second type d'applications repose sur l'utilisation des biomolécules issues des extrêmophiles. Ce sont les enzymes, mais aussi les protéines, les lipides, les polymères, et une grande diversité de métabolites secondaires.

I.6.1 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. D'autres, plus anciennes comme l'utilisation de protéases alcalines dans l'industrie des détergents, sont moins médiatisées, mais d'usage tout aussi généralisé. Plus récemment, le développement de solutions intégrées, combinant à la fois la chimie et l'enzymologie, pour répondre à des processus industriels de conversion complexes est basé sur l'utilisation d'enzymes nouvelles (**Querellou et Guzenec, 2010**).

I.6.1.1 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**).

I.6.1.1.1 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 Guzenec, 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**).

I.6.1.1.2 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).

I.6.1.1.3 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 Guzenec, 2010).

I.6.1.1.4 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 utilisés 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).

I.6.1.2 Biopolymères

En termes d'exploitation biotechnologique, les polymères bactériens présentent quelques atouts comme l'absence de dépendance vis à vis d'aléas climatiques et écologiques pouvant affecter la qualité, le coût et l'approvisionnement de leurs homologues extraits d'algues ou de plantes. Plus de 30 exopolysaccharides présentant des propriétés intéressantes ont été mis en évidence depuis la découverte des sources hydrothermales. Mais les résultats les plus marquants

restent la détermination de structures polysaccharidiques complexes. Un dérivé de bas poids moléculaire (24 000 g/mol) et fortement sulfaté (40 %) a pu ainsi être obtenu à partir d'un exopolysaccharide sécrété en conditions de laboratoire par la bactérie *Alteromonas infernus* isolée du fluide d'un site hydrothermal du bassin de Guaymas. L'étude de son mécanisme d'action par l'équipe du Prof Fischer (HEGP Paris) a montré que, tout comme l'héparine, ce dérivé inhibe la génération de thrombine (**Guezennec, 2004**).

I.6.2 Applications basées sur 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. Comme par exemple les piles à combustible microbienne (MFC), qui sert à convertir directement en électricité l'énergie chimique contenue dans un substrat. La recherche de micro-organismes capables d'oxyder des composés organiques ou inorganiques en couplage avec la réduction d'une électrode dans une pile à combustible pour produire un courant électrique s'est focalisée surtout sur les bactéries mésophiles. Les extrémophiles constituent un gisement très largement inexploré dans ce domaine. Récemment, il a été 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. Ces travaux sont encore embryonnaires (**Querellou et Guzenec, 2010**).

Chapitre II :
Matériel et méthodes

II.1 Site d'étude et échantillonnage

Le prélèvement d'un échantillon d'eau d'une source est une opération délicate à laquelle le plus grand soin doit être apporté. L'échantillon doit être représentatif, homogène et obtenu sans changer les caractéristiques physico-chimiques de l'eau. L'échantillonneur doit avoir une idée des conditions du prélèvement et de son importance pour la qualité des résultats analytiques.

Des échantillons d'eaux ont été prélevés en Mars 2019 à partir d'une source thermale terrestre « Hammam Guergour-Sétif », elle est située à 55 Km au Nord-Ouest de Sétif, elle appartient à la zone montagneuse Nord de la wilaya et se caractérise par un relief marqué par des pentes très fortes et des altitudes très élevées dans sa moitié Sud. Le village se trouve à la sortie des gorges traversées par l'Oued Boussellam et situé à une altitude comprise entre 600 à 1 050 m, dominées notamment par les Djebels Kraim el-Rar et Tafat culminant à plus de 700 mètres d'altitude (Ouali, 2008).

Les échantillons ont été prélevés dans des flacons en verre stériles de 500ml à environ 20 cm de la surface d'eau au niveau d'un point avoisinant la source de l'eau thermale à une distance de quelques mètres dont la température est égale à 45 °C.

Des mesures in situ de la température et du pH sont réalisées respectivement à l'aide d'un thermomètre à immersion avec mercure et d'un multi-paramètre portable (Hanna instruments). Les prélèvements ont été transportés dans une glacière à la température ambiante.

Toute la partie expérimentale a été effectuée au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie de l'université Mohamed Boudiaf-M'sila.



Figure 4 : localisation de « Hammam Guergour » sur la carte (Google Maps mis à jour le 30 mars 2019).

II.2 Isolement, purification et conservation des isolats

II.2.1 Isolement

L'isolement a été effectué dans un délai qui ne dépasse pas les 24 heures après le prélèvement, le Bouillon nutritif (BN) a été utilisé pour le criblage des souches bactériennes à isoler. 1ml d'échantillon d'eau est inoculé dans 9 ml du BN. L'incubation est effectuée à 45 °C jusqu'à l'apparition de trouble. Après, 1 ml de suspension est ensemencé sur la Gélose nutritive (GN) et incubé à 45 °C pendant 24-48 heures.

II.2.2 Purification

Après incubation et développement des différents isolats, des repiquages successifs ont été effectués jusqu'à obtention de colonies pures dans chaque boîte de Pétri sur le même milieu d'isolement.

II.2.3 Conservation des isolats

Les souches pures présentant des aspects différents ont été conservées sur gélose nutritive inclinée à 4 °C et dans des tubes Eppendorf contenant de BN additionné (v/v) de 60 % de glycérol stérile à - 20 °C pour une conservation à long terme.

II.3 Identification des isolats

II.3.1 Caractérisation morphologique et culturelle

II.3.1.1 Examen macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies (forme, pigmentation, taille, opacité, contour, consistance) est déterminé après croissance sur milieu solide.

II.3.1.2 Examen microscopique

- **A l'état frais**

Une préparation à l'état frais permet de déterminer la mobilité des bactéries et d'en déceler la forme (Joffin et Leyral, 2006).

- **Coloration de 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 (modèle Optica microscope) (Voir annexe 1).

Recherche des endospores

Les endospores ont été recherchées à partir des cultures âgées en procédant une coloration négative, elle est réalisée en faisant couler une solution de bleu de méthylène sur un frottis fixé. Le temps de contact est de cinq minutes. La lame est ensuite rincée à l'eau de robinet, séchée puis observée à l'immersion (**Harley et Prescott, 2002**).

II.3.2 Caractérisation physiologique "Température de croissance"

Les isolats ont été inoculés dans des tubes contenant de BN puis incubés à différentes températures (25, 30, 40, 45, 50, 55 et 65 °C) jusqu'à une bonne croissance se produise. Leurs cinétiques de croissance sont ensuite suivies par spectrophotométrie (**Colwell et Grigorova, 1987**).

II.3.3 Caractérisation biochimique

II.3.3.1 Test de Catalase

La plupart des micro-organismes possèdent une catalase, c'est une enzyme, joue un rôle majeur dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène. Le test consiste à prélever une quantité suffisante de culture à partir d'un milieu solide aérobie et la mettre en suspension dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame. Une effervescence due au dégagement de l'oxygène se traduit par la présence de cette enzyme.

II.3.3.2 Test d'oxydase

Ce test détecte un type particulier de la chaîne respiratoire qui comporte à la fin un cytochrome C et l'oxydase associé. Les bactéries qui possèdent une telle chaîne peuvent oxyder des composés chimiques comme le réactif de l'oxydase de Kovacs (dihydrochlorure de tétraméthyl-p-phénylènediamine). Il consiste à prélever une quantité suffisante de culture et la déposer sur un disque ou un papier filtre imprégné du réactif de l'oxydase de Kovacs, placé sur une lame. Les espèces oxydase-positives donnent une coloration violette immédiatement ou dans les dix secondes suivantes (**Singleton, 2005 ; Joffin et Leyral, 2006**).

II.3.3.3 Test de lysine-décarboxylase

Ce test détecte la capacité d'un organisme de produire une LDC, enzyme qui décarboxyle l'acide aminé lysine en cadavérine. On inocule avec l'organisme à tester un tube de bouillon décarboxylase de Moeller contenant du glucose, de la peptone, de la lysine et le pourpre de bromocrésol (comme indicateur de pH). On met à incuber et on examine quotidiennement

pendant 4 jours. Le milieu s'acidifie et devient jaune suite à la métabolisation du glucose, si le milieu reste jaune donc aucune décarboxylase n'est synthétisée, par contre, si le milieu redevient pourpre cela explique que la décarboxylation de la lysine a donné naissance à un produit alcalin alors le pH s'élève (**Singleton, 2005**).

II.3.3.4 Recherche d'uréase

L'uréase est une enzyme hydrolysant l'urée en dioxyde de carbone et ammoniac. On peut détecter la production d'uréase, en préparant une suspension en milieu urée-tryptophane (urée indole), après incubation, la coloration rouge traduit une alcalinisation du milieu donc la bactérie a hydrolysé l'urée par conséquent uréase positive, la coloration orange ou jaune indique uréase négative (**Joffin et Leyral, 2006**).

II.3.3.5 Recherche de tryptophanase

Les bactéries qui possèdent une tryptophanase peuvent hydrolyser le tryptophane en indole, pyruvate et ammonium. Ce test est effectué en inoculant un tube de bouillant urée-indole, la présence d'indole peut être détectée en ajoutant le réactif de Kovacs, la réaction entre l'indole et le Kovacs conduit à la formation d'un anneau rouge. Les bactéries formant cet anneau rouge sont indole positif, son absence indique que les bactéries ne possèdent pas l'enzyme tryptophanase sont donc indole négatif.

II.3.3.6 Utilisation du citrate

Ce test permet de déterminer la capacité des bactéries à utiliser le citrate comme seule source de carbone pour ses besoins énergétiques. Il s'agit d'ensemencer par stries sur la pente de la gélose citrate simmons à l'aide d'une pipette Pasteur fermée. La dégradation du citrate se traduit par une alcalinisation du milieu révélée par virage de la couleur du bleu de bromothymol et par conséquent le test citrate positif (**Harley et Prescott, 2002**).

II.3.3.7 Utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron

La gélose TSI ou Triple Sugar Iron, est un milieu proposé par **Hanja (1945)**, permet de mettre en évidence l'attaque du glucose, du lactose et/ou du saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré et de gaz. L'utilisation de ces sucres a été étudiée en effectuant des stries à la surface de la pente, puis en ensemençant le culot par une pique centrale (**Singleton, 2005**).

II.3.3.8 Test mannitol-mobilité

La fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries sont étudiées sur le milieu semi-solide mannitol-mobilité. On les recherche en ensemençant le milieu par piqure centrale. Les bactéries mannitol positif acidifient le milieu et il vire au jaune (teinte du rouge de phénol en milieu acide). Les bactéries mobiles essaient à partir de la strie d'inoculation et troublent le milieu et les bactéries immobiles persistent près de la piqure centrale (**Joffin et Leyral, 2006**).

II.3.3.9 Test de type respiratoire

Ce test a été effectué selon la technique décrite par **Guiraud (1998)**, la gélose viande foie coulée dans des tubes a été régénérée pendant 30 minutes au bain d'eau bouillante. Les souches bactériennes ont étéensemencées à l'aide d'une pipette pasteur fermée et chargée en remontant en spirale dans la gélose. Après 24 heures d'incubation, on observe à quel niveau du tube il y a eu culture :

- Culture à la surface : type aérobie stricte ;
- Culture partout sauf à la surface : Type anaérobie strict ;
- Culture dans tout le tube : Type aéro-anaérobie facultatif ;
- Culture près de la surface du tube : Type microaérophile (**Denis et al., 2007**).

II.4 la mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

Les isolats sont soumis à une recherche qualitative d'hydrolases extracellulaires à 45 °C.

II.4.1 Hydrolyse de l'amidon

Un test d'hydrolyse d'amidon est basé sur une réaction d'amidon non hydrolysé avec l'iode. Les souches ont étéensemencées sur gélose nutritive contenant 1 % d'Amidon (voir annexe 2). Après avoir obtenue une culture bactérienne, elle a été recouverte par une solution de lugol. L'amidon donne une couleur bleu foncé, alors que ses produits de dégradation au fur et à mesure que l'hydrolyse progresse deviennent progressivement violets, rouge brunâtre et finalement incolores. L'hydrolyse est mise en évidence par l'absence de coloration autour de la culture (**Colwell et Grigorova, 1987 ; De vos, 2009**).

II.4.2 Hydrolyse de la caséine

Ce test est effectué en ensemencant les souches en une seule strie à la surface d'un milieu gélosé contenant 5 % de lait écrémé (voir annexe 3). Après incubation, une activité caséinolytique se traduit par la présence d'une zone claire autour de la culture (**De vos et al., 2009**).

II.4.3 Hydrolyse du tween 80

Tween 80 (monooléate de polyéthylène sorbitane) c'est le substrat idéal pour montrer une activité lipolytique. Les souches sont ensemencées en strie sur la surface d'un milieu gélosé contenant de tween 80 puis autoclavé (Voir annexe 4). Un résultat positif se traduit par l'apparition de zone opaque autour de la strie hydrolysant le Tween 80 (**Colwell et Grigorova, 1987**).

Chapitre III :
Résultats et Discussion

III.1 Analyse physico-chimique de l'eau thermale de Hammam Guergour-Bougaa-Sétif

La composition chimique des eaux souterraines est dépendante de la composition lithologique des couches traversées et du temps de séjour des eaux. Cette interaction influe sur la teneur de certains éléments minéraux majeurs tels les ions de calcium, de magnésium et de sulfate (**Gouaidia, 2008**).

Les résultats des analyses physico-chimiques sont illustrés dans le tableau (Annexe 3). Les eaux thermales de Hammam Guergour possède un pH légèrement alcalin. Les taux de sulfates et du calcium sont très élevés par rapport aux autres sources thermales en Algérie, selon **Ouali (2008)**, elles se placent par leur composition chimique dans le groupe des eaux sulfatées-calciques et chlorurée sodiques.

III.2 Isolement et purification des isolats

Le bouillon d'enrichissement utilisé pour l'isolement, après 48 heures d'incubation, a montré la présence d'une population bactérienne dans l'échantillon d'eau thermale étudié, cela se traduit par l'apparition d'un trouble, l'ensemencement sur gélose nutritive et les repiquages successifs effectués ont permis la sélection de dix souches, désignées selon un code composé de lettres et de numéros (SGR1, SGR2, SGR3, SGR4, SGR5, SGR6, SGR7, SGR8, SGR9, SGR10). Elles ont montré une meilleure croissance sur gélose nutritive (colonies apparaissent au moins de 24 h d'incubation) cependant, il n'y avait que peu de diversité dans la morphologie des colonies (Figure 5).

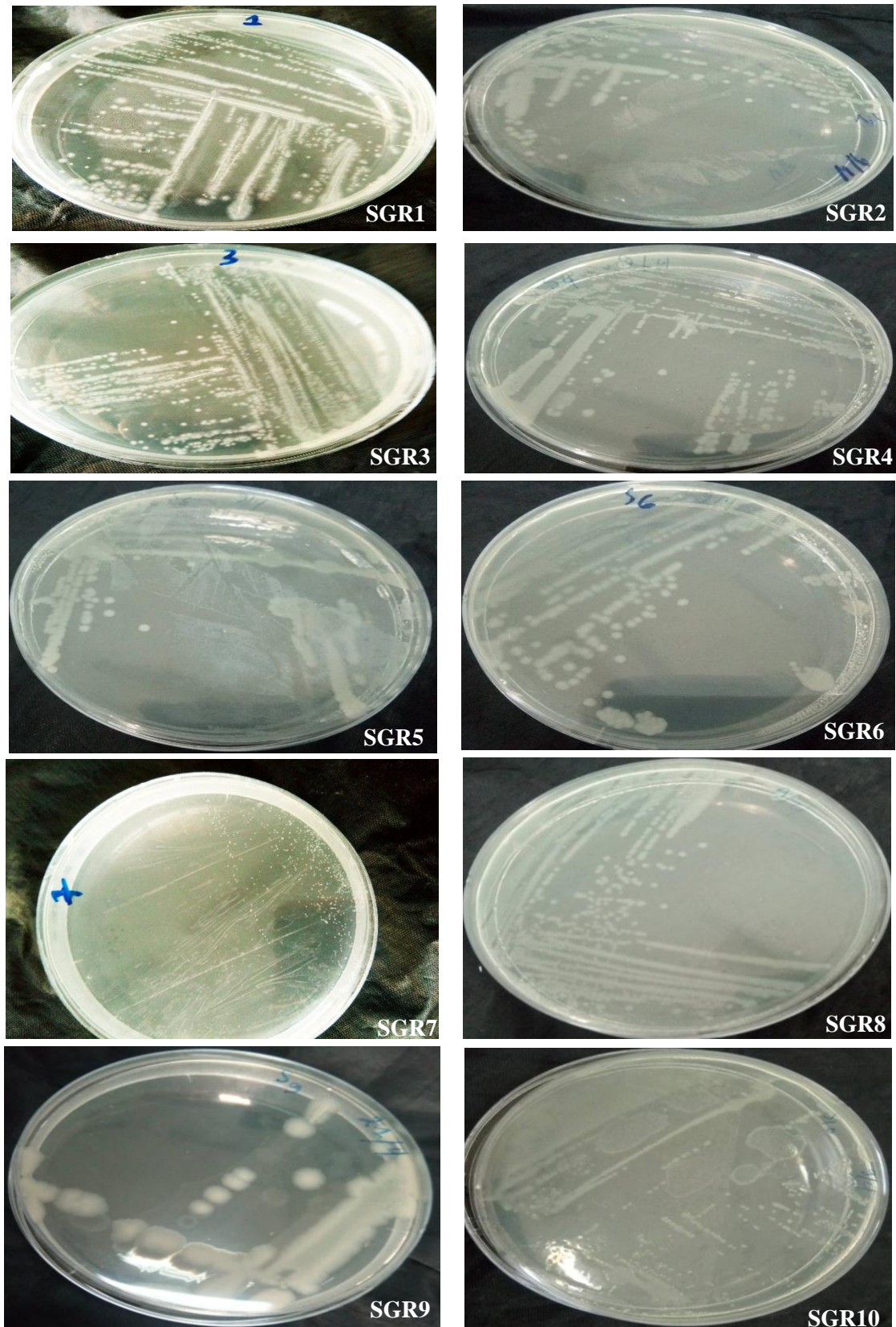


Figure 5 : cultures des différentes souches sur GN.

III.3 Caractérisation phénotypique

III.3.1 Observation macroscopique

L'aspect des colonies bactériennes a été déterminé selon les critères de base décrits par Harley et Prescott (2002) (Tableau 2).

Tableau 2 : l'aspect macroscopique des isolats.

souche	Forme	Taille	couleur	opacité	consistance	aspect
SGR1	bords dentelés	petite	blanchâtre	opaque	crémeuse	lisse
SGR2	ronde	moyenne	Crème	translucide	crémeuse	lisse
SGR3	ronde	moyenne	blanchâtre	opaque	crémeuse	lisse
SGR4	ronde	petite	Crème	translucide	crémeuse	lisse
SGR5	ronde	moyenne	Crème	translucide	crémeuse	lisse
SGR6	ronde	moyenne	Crème	transparente	crémeuse	lisse
SGR7	ronde	fine	blanchâtre	opaque	crémeuse	rugueuse
SGR8	ronde	petite	Crème	translucide	crémeuse	lisse
SGR9	bords dentelés	grande	Beige	opaque	crémeuse	rugueuse
SGR10	ronde	petite	Crème	transparente	crémeuse	lisse

III.3.2 Observation microscopique

L'examen microscopique a révélé les résultats représentés dans le tableau 3. Parmi les dix isolats, neuf sont des bacilles, Gram positif, mobiles et formant des endospores, et un a une forme coccoïde, Gram négatif, et mobiles (Figure 6).

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, Hammam Righa à Ain Defla), dont 44 isolats étaient des bacilles Gram positif, mais aussi, elle a trouvé aussi des bacilles Gram négatif et des Cocci Gram positif.

Tableau 3 : caractérisation cellulaire des isolats.

Souches	Forme	Gram	Regroupement	Mobilité	Endospores
SGR1	bacilles	+	Isolés, en paires	mobile	+
SGR2	bacilles	+	Isolés, en petites chaines	Faible	+
SGR3	bacilles	+	isolés	trop mobile	+
SGR4	bacilles	+	isolés	trop mobile	+
SGR5	bacilles	+	isolés	mobile	+
SGR6	bacilles	+	Isolés, en paires	mobile	+
SGR7	cocci	-	Diplocoques, en chainettes	mobile	-
SGR8	bacilles	+	isolés	mobile	+
SGR9	Longs bacilles aux bouts carrés	+	Isolés, en longues chaines	mobile	+
SGR10	coccobacilles	+	isolés	Trop mobile	+

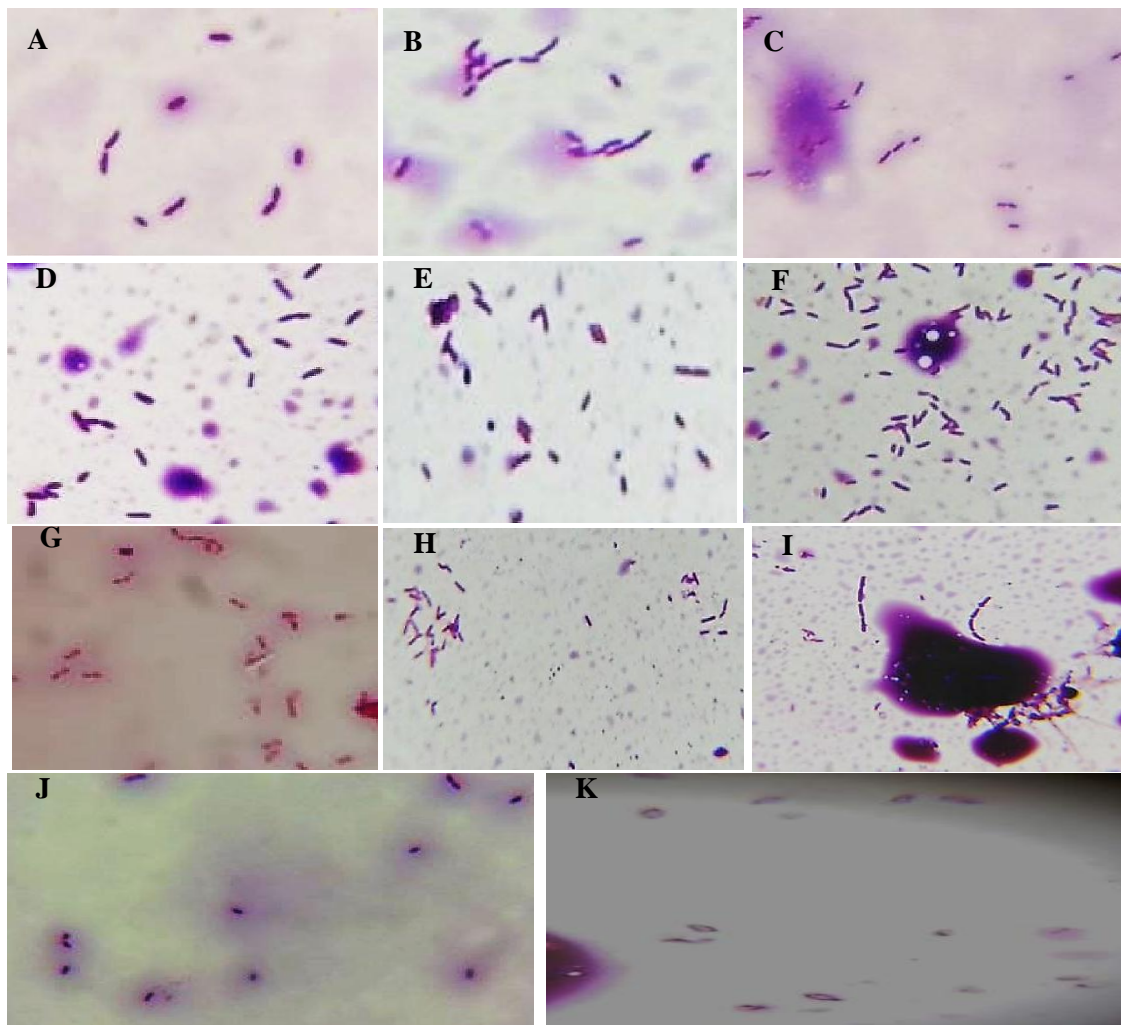


Figure 6 : Observation au microscope photonique (x100). Coloration de Gram (A : SGR1 ; B : SGR2 ; C : SGR3 ; D : SGR4 ; E : SGR5 ; F : SGR6 ; G : SGR7 ; H : SGR8 ; I : SGR9 ; J : SGR10), K : la souche SGR9 avec des endospores déformantes centrales et terminales.

III.4 Température de croissance

Toutes les souches ont été capables de survivre à 45 °C ce qui correspond à la température de la source. Les différentes températures d'incubation varient de 25 à 65 °C montrent qu'elles ont une température de croissance maximale de 55 °C, avec une température de croissance minimale de 30 °C, à l'exception de la souche SGR7, qui n'a pas pu se développer à cette dernière. Leur T_{opt} de croissance comprise entre 45 et 50 °C (Figure 7). Selon **Barton (2005)**, les thermophiles sont classés en thermophiles modérés dont la température de croissance optimale comprise entre 45 et 70 °C et en hyperthermophiles dont la T_{opt} est comprise entre 70 et 110 °C, en se basant sur cette définition, les souches qu'on a isolé et qui possèdent une T_{opt} entre 45 et 50 °C sont qualifiées de thermophiles modérés.

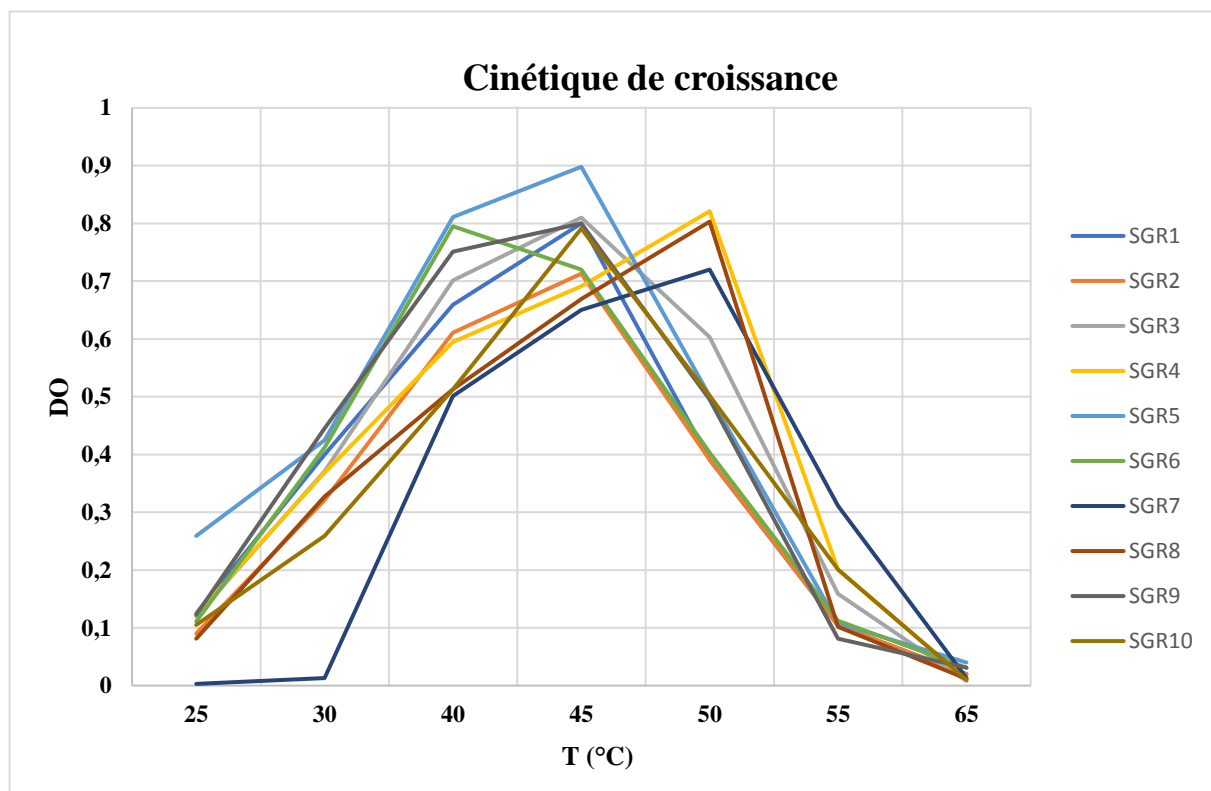


Figure 7 : Cinétique de croissance des souches isolées à plusieurs températures.

III.5 Caractérisation biochimique

Les tests biochimiques définissant une galerie classique ont été réalisés (utilisation des sucres sur milieu TSI, utilisation des citrates, la dégradation des différents acides aminés, la mise en évidence des enzymes respiratoires et autres, et la détermination du type respiratoire) et ont apporté les résultats mentionnés dans le tableau (4).

Tableau 4 : caractérisation biochimique des isolats.

	SGR1	SGR2	SGR3	SGR4	SGR5	SGR6	SGR7	SGR8	SGR9	SGR10
Catalase	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Tryptophanase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uréase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Type respiratoire	AS	AS	AAF	AS	AAF	AS	AAF	AS	AAF	AAF
LDC	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
Glu	ND	ND	+	ND	-	ND	+	ND	+	+
Lac/sacch	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
Cit	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Man	ND	ND	-	ND	+	ND	-	ND	-	-
Production de gaz	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
H₂S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) : réaction positive ; (-) : réaction négative ; ND : non déterminé ; AS : aérobie stricte ; AAF : aéro-anaérobie facultatif.

Les différents résultats des tests biochimiques (Tableau 4) ont montré que toutes les souches analysées sont oxydase et catalase positives à l'exception de la souche SGR7. En ce qui concerne le test du type respiratoire, certains tubes ont présenté des cultures dans la zone superficielle, ce qui définit des souches aérobies strictes et d'autres sur toute la hauteur du tube, définissant des souches aéro-anaérobies facultatives.

On remarque que la plupart des souches peuvent assimiler le citrate comme seule source de carbone et d'énergie, et certaines d'autres sont capables de fermenter le glucose, le lactose et/ou saccharose avec ou sans production de gaz.

On a observé l'absence de l'uréase ainsi que l'enzyme responsable de l'hydrolyse de Tryptophane en indole chez toutes les souches.

III.6 la mise en évidence des enzymes hydrolytiques extracellulaires

Les bactéries thermophiles productrices d'enzymes telles que la protéase, l'amylase et la lipase servent d'outils appropriés pour le développement de la biotechnologie commerciale. Dans notre étude, les activités hydrolytiques (protéolytiques, lipolytique et amylolytique) ont été mis en évidence après 24 heures d'incubation en utilisant les milieux de culture suivants : gélose à amidon 1 %, gélose au lait écrémé 5 %, et gélose au Tween 80.

La caséine dans la gélose au lait écrémé a été hydrolysée par une caséinase produite par ces bactéries thermophiles, des zones claires ont été observées autour de la culture et le Tween 80 a été hydrolysé par une lipase thermorésistante, des zones opaques autour de la culture ont été observées. 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, et c'est ce dernier résultat qu'on a pu trouver dans notre expérience (Figure 8).

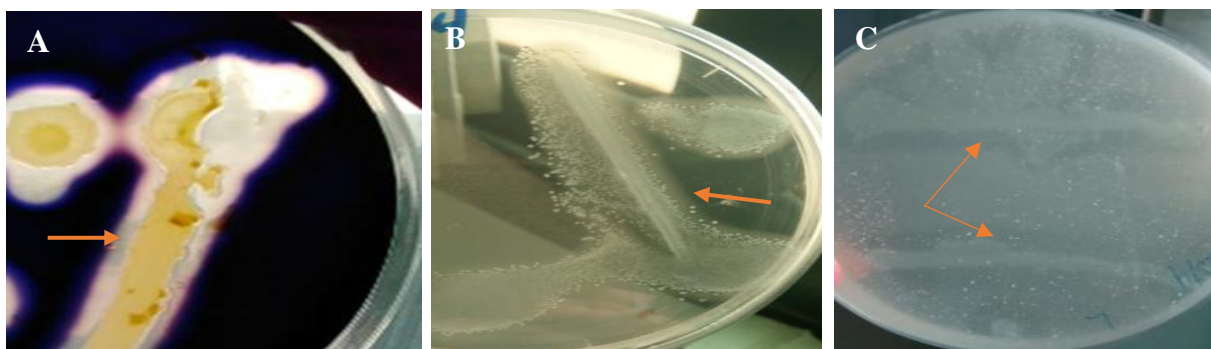


Figure 8 : Exemples d'activités hydrolytiques ; A : hydrolyse de l'amidon par la souche SGR9, B : hydrolyse de la caséine par la souche SGR5, hydrolyse du Tween 80 par la souche SGR10.

Les résultats du tableau 5 montrent que les neuf souches (SGR1, SGR2, SGR3, SGR4, SGR5, SGR6, SGR8, SGR9, SGR10) possèdent une activité protéolytique et seulement la souche SGR7 a une activité négative, et la plupart des souches ont une activité amylolytique et lipolytique. Une étude similaire faite par **GOMRI (2011)**, porte sur les activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermales terrestres de l'Est algérien, a permis l'isolement de 83 souches dont 77 étaient hydrolases positives.

Tableau 5 : Résultats des activités hydrolytiques.

	Amylase	Protéase	Estérase
SGR1	+	+	+
SGR2	-	+	+
SGR3	-	+	+
SGR4	-	+	-
SGR5	+	+	+
SGR6	+	+	+
SGR7	+	-	-
SGR8	-	+	+
SGR9	+	+	-
SGR10	+	+	+

(+) : présence (-) : Absence

L'ensemble des caractères d'identification comprenant, la forme, le Gram, la mobilité des souches, le type respiratoire, et la production des spores révèle les traits caractéristiques des *Bacillus*, Selon **Nazina (2001)**, 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 croître à des températures mésophiles et thermophiles (30-55 °C), en fonction de la souche. Quelques exemples d'espèces comprennent *Bacillus coagulans*, *B.licheniformis*, *B.pumilus*, *B.sporothermodurans* et *Bacillus subtilis* (**Barbarous et Gulsun., 2014**). Nos souches ont été capables de multiplier à des températures comprises entre 30 et 55 °C.

Malkawi et Al-Omari 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.

Les bactéries de ce genre ont été isolées de tous les sites explorés, cela pourrait être due à leur adaptation aux environnements chauds, elles ont également des besoins nutritionnels généralement simples.

Les résultats nous ont permis donc l'orientation vers le genre *Bacillus* et autres dont les tests effectués sont insuffisants pour l'identifier. Pour pousser l'identification, on a utilisé un système automatisé d'identification biométrique (ABIS) basé sur des caractères morphologiques et biochimiques. Les résultats sont montrés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Résultats d'identification biométrique des isolats.

Isolat	Souche similaire	Pourcentage de similarité %
SGR1	<i>Bacillus tequilensis</i>	91.5
SGR2	<i>Bacillus pumillus</i>	98.3
SGR3	<i>Bacillus licheniformis</i>	78
SGR4	<i>Brevibacillus brevis</i>	97.9
SGR5	<i>Bacillus Smithii</i>	86.8
SGR6	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	91.1
SGR8	<i>Bacillus Smithii</i>	91.7
SGR9	<i>Bacillus subtilus</i>	91.3
SGR10	<i>Bacillus thuringiensis</i>	87.9

Enfin, cette étude nous a permis de caractériser et d'identifier des bactéries capables de survivre dans un milieu extrême, et de montrer leur place dans la biotechnologie étant que productrices d'enzymes thermorésistantes.

Conclusion générale
& Perspectives

Conclusion générale et perspectives

Les bactéries thermophiles occupent, de plus en plus, une place importante dans la biotechnologie moderne en raison de leur potentiel à produire des biomolécules hautement stables. C'est pourquoi leur isolement à partir des sources chaudes et leur identification font l'objet d'étude d'intenses recherches.

Les résultats de notre étude ont mis en relief différentes activités enzymatiques extracellulaires des souches bactériennes isolées de la source thermale Hammam Guergour-Sétif.

Dix souches ont été isolées à 45 °C sur gélose nutritive, elles ont subi une caractérisation phénotypique et physiologique suivie d'une analyse biochimique. Les résultats ont montré que ce sont des aérobies et aéro-anaérobies facultatives, thermophiles modérés facultatifs, mobiles, et la plupart sont des bacilles Gram positif et sporulantes, ces derniers présentent deux genres *Bacillus* et *Brevibacillus* avec dominance du genre *Bacillus*.

Trois hydrolases ont été mises en évidence (amylases, protéases et estérase) sur le même milieu d'isolement additionné respectivement de l'amidon, lait écrémé, Tween 80. Une forte activité protéolytique est enregistrée chez la majorité des souches isolées.

En fin ce travail a permis l'exploitation d'un biotope extrême (Hammam Guergour). Ce Hammam abrite une micro flore particulière possédant un optimum de température de 45 à 50 °C. Les thermophiles possèdent des activités intéressantes pour la bio-industrie et pour la dépollution des eaux thermales attendant une étude détaillée des isolats pour renforcer leur potentiel, une optimisation supplémentaire des paramètres de croissance pour une activité enzymatique extracellulaire optimale peut être réalisée, leurs gènes peuvent être identifiés et clonés pour produire des enzymes recombinantes et ensuite utilisé pour la production industrielle

Références

Bibliographiques

A

- **Aanniz T., Ouadghiri M., Melloul M., Swing J., Elfahim E., Ibijbijben J., Ismaili M., Ammar M. (2015).** Thermophilic bacteria in Moroccan 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).

B

- **Barbarous Ozer., GulsunAkdemir-Evrendilek. (2014).** Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments. CRC Press. P: 13.
- **Barton L.L., (2005).** Structural and Functional relationships in prokaryotes. USA: Springer science and Media. 817p.

C

- **Capdepuy M., Canellaa J. (1995).** La flore bactérienne des eaux thermales et minérales. *La Huille blanche*. No 2-3, p.70-72.
- **Colwell R.R., Grigorova R. (1987).** *Methods in Microbiology*. 1^{ère} éd. London: Academic Press. 518p

D

- **De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B. (2009).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2^{ème} éd. Vol 3, *The Firmicutes*. Springer, New York, USA.
- **Denis E., Ploy M C., Martin C., Bingen E., Quentin R. (2011).** *Bactériologie médicale Techniques usuelles*. 2^{ème} éd. Paris : Masson. 631p.

F

- **Ferrera I., Reysenbach A L. (2007).** Thermophiles in: Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons ; P : 1-9.

G

- **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. 136 pages. Mémoire Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister, biotechnologie alimentaire, institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies, Agro-alimentaires, Université Mentouri, Constantine.
- **Goaidia L. (2008).** Influence de la lithologie et des conditions climatiques sur la variation des paramètres physico-chimiques des eaux d'une nappe en zone semi-aride, Cas de la nappe de Meskiana nord-est Algérien. Th : Sc. : Annaba, 130 p.
- **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.
- **Guezennec, J. (2004).** Les bactéries des sources hydrothermales profondes à l'origine de nouvelles molécules bioactives. *Vertig O la revue électronique en sciences de l'environnement*, Vol. 5, no.3.
- **Guiraud J.P. (1998).** Techniques d'analyse microbiologique. *In : Microbiologie alimentaire*. Paris : Dunod. p. 168-333.

H

- **Harley J.P., Prescott L.M. (2002).** *Laboratory Exercises in Microbiology*. 5ème éd. Mc Graw Hill. 466p.

J

- **Joffin J.N., Leyral G. (2006).** *Microbiologie technique : dictionnaire de techniques*. 4^{ème} éd. Espagne : Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine. 363 p.

L

- **Larbi Daouadji, K. (2015).** *Isolement et caractérisation des souches productrices de lipase*. 165 pages. Thèse en vue de l'obtention d'un diplôme de doctorat, microbiologie moléculaire et protéomique, faculté des sciences, Université Djillali Liabes, Sidi Bel abbes, Algérie.

M

- **Madigan M., Martinco J. (2007).** *Biologie des micro-organismes*. 11^{ème} éd. Paris : Pearson éducation France.1047p.
- **Malkawi H.I, Al-Omari M.N. (2010).** Culture-dependent and culture-independent approaches to study the bacterial and archaeal diversity from Jordanian hot springs. *Afr J Microbiol Res* 4 :923-932.
- **Minic Z., Serre V., Hervé G. (2006).** Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *Comptes rendus biologies*. Vol.329, p.527.
- **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

- **Nazina T.N., Tourova T.P., Poltaraus A.B., Novikova E.V., Grigoryan A.A., Ivanova A.E., Lysenko M., Petrunyaka V.V., Osipov G.A., Belyaev S.S., Ivanov M.V. (2011).** Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol.51, p.433-446.
- **Nshimiyimana J.B., Khadka S., Mwizerwa1 E.M., Akimana1 N., Adhikari S., Nsabimana A. (2018).** Thermophiles: Isolation, characterization and screening for enzymatic activity. *Bioscience discovery*. Vol.9, no.3. P.430-437.

O

- **OUALI, S. (2008).** Les sources Thermales en Algérie. Division Energie Solaire Thermique et géothermie. *Recherche et Développement*, 3p.

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.
- **Postec, A. (2005).** Diversité des populations microbienne thermophiles dans d'un cheminée hydrothermale océanique : culture d'enrichissement en bioréacteur et isolement d'espèces nouvelles. 292p.Thèse de doctorat, Ecole doctorale des sciences de la vie et de la nature, Université de Provence, Marseille, France.
- **Prakash O., Jaiswal N. (2010).** α -Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*.Vol.160, no.8. p.2401-2414.

Q

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

S

- **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^{ème} éd). New York: *Springer*.P.137-184.
- **Singleton, P. (2005).** *Bactériologie pour la médecine, la biologie, et les biotechnologies.* 6^{ème} éd. Paris : Dunod.542p.
- **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.

Annexes

Annexe 1

Coloration de Gram

Le bactériologiste Danois Hans Christian Joachim Gram en 1884, a mis au point une méthode de coloration des bactéries, appelée coloration de Gram (ou coloration de Gram), qui est utilisé pour identifier et classifier les bactéries. Certains genres de bactéries ont en commun une membrane qui retient certains colorants. Ils forment le groupe des bactéries Gram Positives (Gram +). Toutes les autres bactéries soit qu'elles n'ont pas de membrane soit que la nature de leur membrane est totalement différentes se laissent décolorer par la méthode de Gram. Elles sont dites Gram négatives (Gram -).

❖ Réactifs

Violet de gentiane

violet de gentiane.....	1 g
alcool éthylique à 95 %.....	10 ml
phénol ajoutés à 100ml d'Eau distillée.....	2 g

Liquide de Lugol (IKI)

Iode.....	1 g
Iodure de potassium.....	2 g
Eau distillée.....	300 ml

Solution de Fuchsine

Solution de fuchsine saturée dans l'alcool.....	10 ml
Eau distillée.....	90 ml

❖ Protocole

1. Près d'un bec bunsen : prélever un frottis des bactéries de la culture à l'aide d'une oeuze et les poser sur une lame. La passer au-dessus bec bunsen pour sécher la lame. Dans cette étape tout est stérile (milieux+objets manipulés). La lame est posée sur des languettes en plastique.
 2. Recouvrir la lame d'alcool pour fixer le frottis.
 3. Pencher la lame et verser du violet de gentiane dessus puis laisser agir 1 minute. Rincer à l'eau distillée.
 4. Pencher la lame et recouvrir de solution de Lugol. Laisser agir 30 secondes puis rincer à l'eau distillée.
 5. Verser quelques gouttes d'alcool sur la lame puis rincer à l'eau distillée.
 6. Pencher la lame et recouvrir de fushine en évitant le frottis. Laisser agir 10-20 secondes puis rincer à l'eau distillée. Répéter cette manipulation pour chaque lame, frottis et bactéries.
- Observer au microscope optique puis recouvrir la lame d'huile à immersion.

Annexe 2

Composition des milieux de culture

- **Bouillon nutritif**

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,2 ± 0,2.	

- **Gélose nutritive**

Peptone	15 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	02 g
Chlorure de sodium	05
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH =6,8-7,4	

- **Milieu TSI (triple sugar iron agar)**

Composition en g/l eau distillée

Peptone	20
Agar	12
Lactose	10
Saccharose	10
Na Cl	05
Extrait de levure	03
Extrait de viande	03
Glucose	01
Citrate de fer	03
Na ₂ S ₂ O ₃	0,3
Rouge de phénol	0,025
pH7.4 ±0.2 à 25°C	

- **Milieu citrate de Simmons**

Composition en g/l eau distillée

Agar	15
Na Cl	05
Sodium citrate	02
K ₂ HPO ₄	01
(NH ₄)H ₂ PO ₄	01
MgSO ₂ 7H ₂ O	0,2
Bleu de bromothymol	0,08
pH 6.9 ± 0.2 à 25° C	

- **Milieu Mannitol Mobilité Nitraté**

Composition en g/l eau distillée

Peptone trypsique de viande	20
Mannitol	02
RP1 %	4 ml
Nitrate K	01
Agar	04
pH = 7,6 - 7,8	

- **Milieu urée-indole**

Composition en g/l eau distillée

Tryptophane.....	03
Urée	20
KH ₂ PO ₄	01
K ₂ HPO ₄	01
Na Cl	05
Alcool à 95°	10 ml
Rouge de phenol	2,5 ml

- **Gélose viande-foie**

Extrait de viande	10 g
Peptone	20 g
Extrait de levure	10 g
Glucose	05 g

Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,6

- **Gélose à l'amidon**

Gélose nutritive	100 ml
Amidon	01 g

- **Gélose au lait**

Poudre de lait	05 g
Eau distillée	50 ml
Agar	02 g
Eau distillée	50 ml

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

- **Milieu pour mettre en évidence la dégradation du Tween 80**

Peptone	10 g
Chlorure de sodium	05 g
Chlorure de calcium	01 g
Agar	25 g
Eau distillée	1000 ml

10 gouttes du Tween 80 autoclavé sont ajoutées à 25 ml du milieu spécifique.

Annexe 3

Analyse physico-chimique de l'eau de Hammam Guergour

Hammam Guergour	
T (°C)	45
pH	7,4
Ca^{2+}	596.8 mg/l
Mg^{2+}	177.87 mg/l
Cl^{-}	789.66 mg/l
SO_4^{-2}	1566.8 mg/l
HCO_3^{-}	439.2 mg/l
Salinité	2.1 %
Turbidité	13.2 NTU

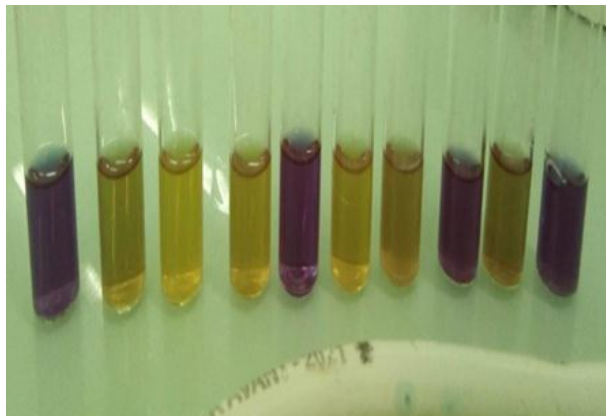
Comme la plupart des écosystèmes dans lesquels ou à coté desquels évolue l'homme, les eaux minérales et thermales ne sont pas stériles. Elles sont l'habitat d'une flore bactérienne dont l'identité et la physiologie dépendent des caractères physicochimiques de l'environnement (température, pH, potentiel rédox des eaux, présence des composés organiques et inorganiques pour n'en citer que quelques un). Chaque eau minérale représente donc un écosystème particulier et héberge une flore bactérienne propre qui s'adapte à ses conditions spécifiques, mais qui à son teneur agit sur elles (**Capdepuy et Canellaa, 1995**).

Annexe 4

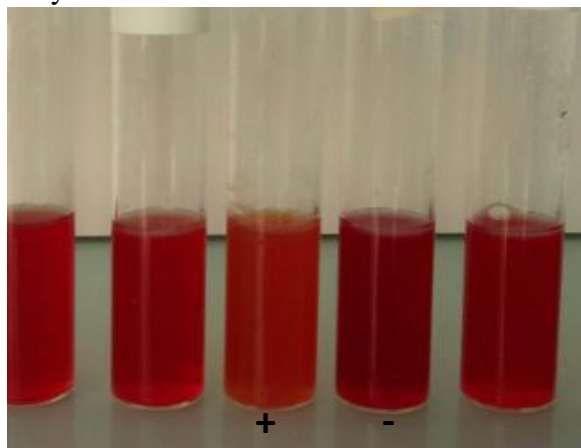
Résultats de quelques tests biochimiques



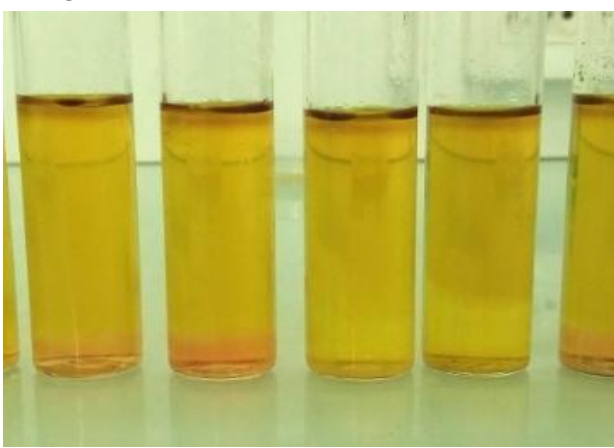
Oxydase



LDC



Mannitol-mobilité



Indole (résultat négatif)



Citrate



Catalase

Résumé

En Algérie, pas beaucoup d'études des sources thermales et des thermophiles ont été réalisées. Les bactéries thermophiles sont moins étudiées mais constituent un groupe important de micro-organismes en raison de leur capacité à produire des enzymes d'intérêt industriel. Dans cette étude, des bactéries thermophiles ont été isolées de l'eau thermale de Hammam Guergour-Sétif. Dix souches ont été purifiées et caractérisées en utilisant des approches phénotypiques, physiologiques et biochimiques. Les résultats ont montré la présence de deux genres *Bacillus* et *Brevibacillus* avec dominance du genre *Bacillus*, et autre dont les tests effectués sont insuffisants pour une identification plus poussée, comme ils ont montré une excellente activité enzymatique extracellulaire. *Bacillus sp.* Pourrait être une source de divers exo-enzymes thermostables.

Les mots clés : sources thermales, thermophiles, *Bacillus*, *Brevibacillus*, activité enzymatique extracellulaire.

Abstract

In Algeria not much of study of hot springs and Thermophiles have been done. Thermophilic bacteria are less studied but are important group of microorganisms due to their ability to produce industrially important enzymes. In this study, thermophilic bacteria were isolated from hot water of Hammam Guergour-sétif. Ten strains were purified and characterized by using phenotypic and biochemistry methods. Results showed the presence of two genera *Bacillus* and *Brevibacillus* with dominance of *Bacillus*, and other such tests are insufficient for identification further. In addition, they exhibited considerable amount of extracellular enzyme activity. *Bacillus sp* could be a source of various thermostable exozymes.

Key words: hot springs, Thermophiles, *Bacillus*, *Brevibacillus*, extracellular enzymatic activity.

ملخص:

في الجزائر لا توجد دراسات كثيرة حول الينابيع الحارة والمركبات الحرارية. البكتيريا المحبة للحرارة أقل دراسة ولكنها تشكل مجموعة مهمة من الكائنات الحية الدقيقة بسبب قدرتها على إنتاج إنزيمات ذات أهمية صناعية. خلال هذه الدراسة تم عزل البكتيريا المحبة للحرارة من مياه حمام فرفور الحارة بسطيف. تم انتقاء عشر سلالات ودراسة خصائصها باستخدام مناهج ظاهرية، فيسيولوجية، وكيموحيوية. أظهرت النتائج وجود جنسين من البكتيريا هما *Bacillus* و *Brevibacillus* مع هيمنة جنس *Bacillus*، و جنس اخر حيث أن هذه الاختبارات غير كافية لتحديد هويته، كما أنها أظهرت نشاط انزيمي خارج خلوي كبير. يمكن أن تكون مصدرا لمختلف الإنزيمات المقاومة للحرارة.

الكلمات المفتاحية: الينابيع الحارة، البكتيريا المحبة للحرارة، *Bacillus*، *Brevibacillus*، نشاط انزيمي خارج خلوي.