

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES  
DE LA TERRE ET DE L'UNIVE  
DEPERTEMENT DE BIOLOGIE



**Mémoire de Master**

**Domaine : Science de la Nature et de la Vie**

**Filière : Biologie**

**Spécialité : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire**

**Thème : Isolement et criblage enzymatiques et antimicrobiens  
de bactéries thermophiles de Hammem Debagh**

**Présenté par :**

- Belhaine Bouthaina
- Latreche Manel

**Devant le jury composé de :**

**Président : Mme Kachi .N**

**Examineur : Mr Gueroui .Y**

**Encadreur : Mr Mokhtari .A**

(Université de Guelma)

(Université de Guelma)

(Université de Guelma)

**Juin 2016**

## *Remerciements*

*On remercie, en premier lieu, notre encadreur Monsieur Mokhtari qui a bien dirigé ce travail, avec ses conseils, sa compétence et sa gentillesse qui nous à permis De bien améliorer ce travail.*

*On remercie également Madame kachi N. de d'avoir fait honneur de présider notre jury de soutenance.*

*Nos plus vifs remerciements s'adressent aux Monsieur Gueroui Y. Pour avoir accepté d'être membres de ce jury.*

*Nos remerciements à Madame Bahia et Madame Ratiba d'avoir facilité le travail au laboratoire de Microbiologie de l'université 08 Mai 1954 Guelma.*

*Nous associons nos remerciements pour toute l'équipe du laboratoire de microbiologique et biochimies ainsi que tous nos collègues pour leur solidarité*

## *Délicace*

Je dédie ce modeste travail à:

- \* A mes parents
- \* A mon frère
- \* A mes sœurs
- \* A ma famille
- \* A mes Amies
- \* Aux étudiants de Master de qualité de produit et sécurité alimentaire  
(2015/2016)

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des schémas

## Introduction

### Chapitre I : Les microorganismes thermophiles

1. les sources thermophiles et hyperthermophile.....	1
2. les bactéries des sources hydrothermales .....	1
3. les thermophiles .....	2
4. Les diversité des thermophiles .....	2
4.1. Les bactéries.....	3
4.2. Les Eukarya.....	5
4.3. Les Archea.....	5
5. les niches écologiques.....	6
5.1. Biotopes naturelles.....	6
5.2. biotopes artificiels .....	7
6. Les base moléculaire des thermophiles.....	7
6.1. Les lipides .....	8
6.2. Les Acide nucléiques.....	8
6.3. Les protéines .....	9

### Chapitre II : Les Applications des thermophiles et de leur biomolécule

1. Les Applications basées sur les cellules entières.....	9
1.1. Les Agents de minéralisation.....	9
1.2. Production d'hydrogène.....	10
1.3. Piles à combustible microbiennes.....	10
2. Les Applications basées sur les biomolécules.....	10
2.1. Les Enzymes.....	10
2.1.1. Les enzymes de dégradation et de modification des polysaccharides	
2.1.2. Les enzymes du dégradation des pectines.....	10
2.1.3. Les enzymes modifiant l'amidon.....	11
2.1.4. Les Protéase.....	12
2.1.5. Les enzymes de manipulation des acides nucléiques.....	12
2.1.6. Les Autre et enzyme.....	12
2.2. Les liposomes.....	13

### Chapitre III : MATERIEL ET METHODES

1. Echantillonnage.....	14
1.1. présentation du site d'étude .....	14
1.2. Les caractéristique physico-chimiques des eaux des échantillonnage..	16

2. Prélèvement d'échantillons.....	16
5. Enrichissements .....	17
6. Isolement et purification des isolats .....	17
7. Conservation des isolats.....	19
8. Détermination des caractéristiques phénotypiques.....	19
8.1. Caractéristiques macroscopique et microscopique.....	19
8.2. Caractéristiques biochimiques.....	20
8.2.1. Recherche de la catalase .....	21
8.2.2. Test mannitol – mobilité.....	21
8.2.3. Plaque api 20 <sup>E</sup> .....	22
9. Mise en évidence des enzymes extracellulaire.....	23
9.1. Détermination de l'activité amylolytique.....	23
9.2. Détermination de l'activité protéolytique .....	23
9.3. Détermination de l'activité lipolytique.....	23
10. Mise en évidence de l'activités antimicrobiennes .....	24
10.1. Technique des cylindres d'agar.....	24
<b>Chapitre IV : Résultats et discussion</b>	
I. Résultats .....	25
1. Isolement et purification des isolats .....	25
2. Identification phénotypiques des isolats.....	25
2.1. Caractère macroscopique et microscopique des isolats .....	27
2.2. Identification biochimique des isolats.....	28
2.2.1. Recherche de la catalase.....	29
2.2.2. Test mannitol-mobilité.....	29
2. 2.3. Plaque API 20E.....	30
3. Mise en évidence des enzymes extracellulaires.....	31
4. Mise en évidence de l'activités antimicrobiennes.....	37
4.1. Technique de diffusion en disque.....	37
II. Discussion	
Conclusion	
Références bibliographiques	
Annexe	
Résumé	

## Liste des tableaux

N° de Tableau	Titre	N° de Page
<b>01</b>	Les caractéristiques physico – chimique des sources thermales	16
<b>02</b>	Aspects macroscopique et microscopique des souches sélectionnées	25 -26
<b>03</b>	Résultats de la plaque API 20E de P5GN, P4GN, P3GN.	31
<b>04</b>	Résultats d'activités enzymatiques des isolats étudiées	32
<b>05</b>	Résultats du test du diffusion sur disque	37

## Liste des figures

N° de Figure	Titre	N° de Page
<b>01</b>	Terminologie des extrémophiles en fonction de la température et du pH	
<b>02</b>	Arbre phylogénique simplifié des bactéria	<b>04</b>
<b>03</b>	Arbre phylogénique simplifié des Eukarya.	<b>04</b>
<b>04</b>	Arbre phylogénique simplifié des Archaea	<b>05</b>
<b>05</b>	Localisation de site d'étude: Hammam Debagh —Guelma- (Google Earth)	<b>14</b>
<b>06</b>	Vue général des bassins de prélèvements	<b>15</b>
<b>07</b>	Aspects microscopique des souches sélectionnées.	<b>27</b>
<b>08</b>	Aspects microscopique des souches sélectionnées	<b>28</b>
<b>09</b>	résultat de la catalase	<b>29</b>
<b>10</b>	Résultat des cultures de trois souches P5GN, P4GN, P3GN, sur le milieu Mannitol-mobilité	<b>29</b>

<b>11</b>	Galerie Api20E, appliquée sur les milieux P5GN, P4GN, P3GN	<b>30</b>
<b>12</b>	Activités enzymatiques de Dégradation de l'amidon	<b>33-34</b>
<b>13</b>	Activités enzymatiques de Dégradation du tween 80	<b>35</b>
<b>14</b>	Activités enzymatiques de Dégradation de la caséine	<b>36</b>
<b>15</b>	les zones d'inhibition de la technique de diffusion sur disque	<b>38</b>

### Liste de schémas

<b>N° de schéma</b>	<b>Titre</b>	<b>N° de page</b>
01	Isolement des bactéries thermophiles	18

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide déoxyribo nucléique

**ARN** : Acides ribonucléiques

**PH** : Potentiel hydrogène

**Ni** : Nicle

**Fe** : Fer

**Ca<sup>2+</sup>** : Calcium

**EC** : Enzyme commission numbers

**PCR** : Réaction en chaine par polymérase

**L** : Longueur

**Min** : minute

**S** : seconde

**ml** : millilitre

**T** : Température

**O<sub>2</sub>** : Oxygène

**Ox/ Red** : Oxydation /Réduction

**Cm** : centimètre

**µs** : micro simans

**BN** : Bouillon Nutritive

**GN** : Gélose Nutritive

**API** : Analytique Prophylactic Index

**CIT** : Citrate

**VP** : Voges Proskawer

**GEL** : Gélatine (origine bovine)

**ADH** : Arginine dihydrolase

**LDC** : Lysine Décarboxylase

**ODC** : Ornithine Décarboxylase

**URE** : Uréase

**ONPG** : Ortho –Nitrophényle-B-D-Galactosidase

**H<sub>2</sub>O** : Sodium thiosulfate

**TDA** : Tryptophane Désaminase

**IND** : Indole

**GLU : Glucose**

**MAN : Mannitol**

**INO : Inositol**

**SOR : Sorbitol**

**RHA : Rhamnose**

**SAC : Saccharose**

**MEL : Melibiose**

**AMY : Amygdaline**

**ARA : Arabinose**

# *INTROUDUCTION*

**introduction :**

L'étude des extrêmophiles fournit de nouvelles clefs à la compréhension des processus de la vie dans des conditions extrêmes. (**Antranikian, 2009**).

Les microorganismes appelés "extrêmophiles" sont spécifiquement adaptés à des milieux écologiques particuliers où ils se développent activement alors qu'ils ne survivent pas dans des conditions "ordinaires".

Parmi les microorganismes qualifiés d'extrêmophiles, on rencontre ceux qui vivent en présence de fortes concentrations de sel (halophiles), ceux qui se développent à des températures froides ou chaudes (psychrophiles et thermophiles), et/ou dans des milieux très acides ou basiques (acidophiles et alcaliphiles) ou sous pressions élevées (piézophiles).  
(**YOUSFI AHMED 2013**)

## **I. Les microorganismes thermophiles**

### **1-Les sources thermales et hydrothermales.**

L'origine des sources hydrothermales profondes est une conséquence de la dérive des continents. La surface du globe est divisée en sept plaques de croûte terrestre principales rigides et en une série de plaques, plus petites, qui sont en mouvements et s'écartent les unes des autres. La zone de fracture est caractérisée par une très forte activité volcanique ces sites sont le siège des principales manifestations hydrothermales. L'eau de mer s'infiltré dans les fissures et se réchauffe au contact de la roche basaltique (ou roches profondes du manteau) 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<sub>2</sub>S, CH<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub> ainsi qu'en éléments métalliques tels que Mn<sup>2+</sup> Fe<sup>2+</sup> Li<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> ( Minic *et al.*, 2006)

### **2. 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*, *Pyrodicticum*, *Thermococcus*, *Pyrococcus*, *Thiothrix*), des bactéries sulfatoréductrices (*Archaeoglobus*), 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).

### **3. Les thermophiles**

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 le thermophile. La plus reconnue est celle qui a été proposée

par Thomas Brock, le microbiologiste à l'origine de la découverte des microorganismes 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 3 sous-catégories au sein des thermophiles :

- Les **thermophiles modérés** dont les conditions optimales de croissance se situent entre 55 et 65°C
- **thermophiles extrêmes** dont la température optimale de croissance est comprise entre 65 et 80°C
- **hyper thermophiles** dont la température optimale de croissance est supérieure à 80° (Alain et al., 2011)

#### 4. La Diversité des thermophiles

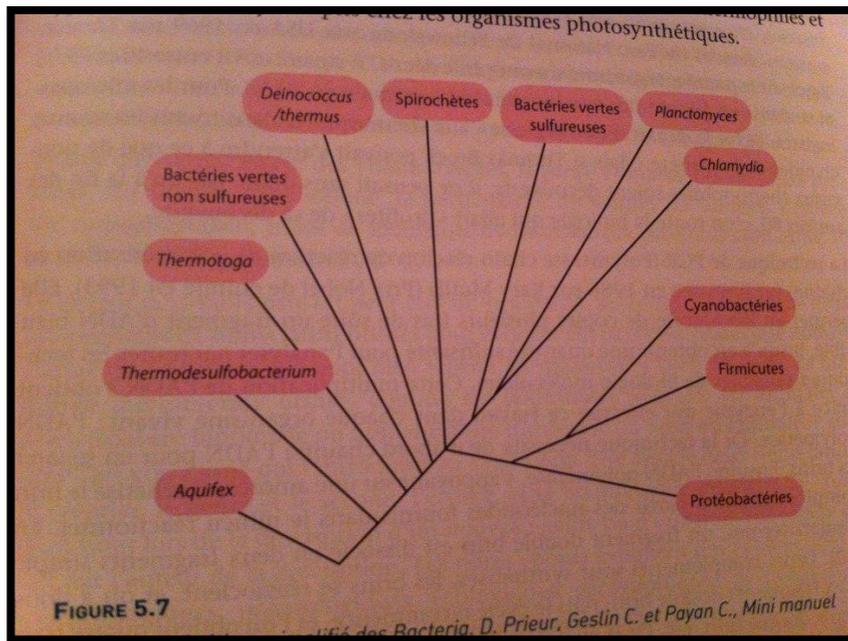
##### 4.1. Les bactéries

Le domaine des bactéries comporte de nombreux thermophiles et hyperthermophiles y compris chez les organismes photosynthétiques. *Chlorobium tepidum* est une bactérie photosynthétique anaérobie de la lignée des bactéries vertes sulfureuses. Elle a été isolée d'une source chaude en Nouvelle-Zélande et se développe à l'optimum à des températures de 47-48°C.

La lignée des bactéries vertes non-sulfureuses comporte elle des espèces thermophiles. Les bactéries du genre *Chloroflexus* sont des phototrophes anaérobies, non obligatoires vivant dans des environnements chauds (60°C) au pH légèrement alcalin.

La lignée des cyanobactéries (phototrophes oxigéniques) comporte aussi des espèces thermophiles, par exemple *Synechococcus vulcanius* dont la température optimale de croissance est proche de 60°C et certaines espèces croissent jusqu'à 74°C.

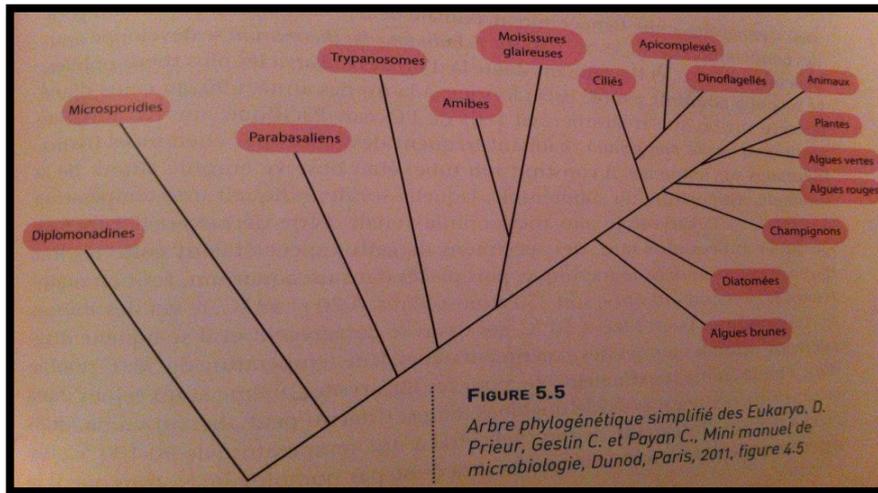
Les thermotogales (avec les genres *Thermotoga*, *Petrotoga*, *Geotoga*, *Marinitoga*, *Thermosipho*) comportent des nombreuses espèces thermophiles et hyperthermophiles. Ces organismes vivant dans les sources chaudes terrestres et marines, ainsi que les réservoirs pétroliers. Ce sont des organismes hétérotrophes, anaérobies stricts qui fermentent divers composé organiques. *Thermotoga maritima* a été isolée de sources chaudes marines, cette bactérie vit entre 55 et 90°C et sa température optimale est de 80 °C (Daniel., 2014).



**Figure N°1 :** Arbre phylogénique simplifié des bactéria. (D.prieur, Geslin C.et Payan C., Mini manuel de microbiologie, Dunod, Paris, 2011).

#### 4.2. Les Eukarya :

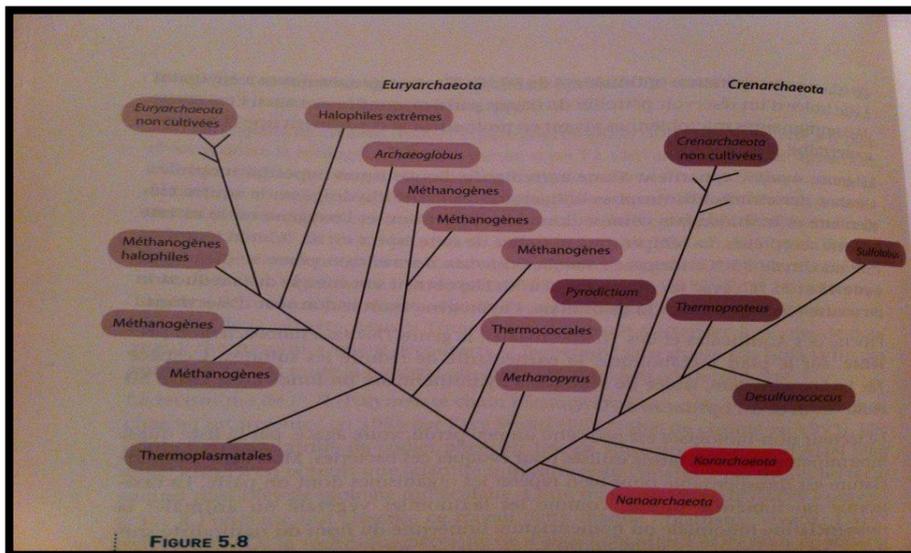
Chez les *Eukarya*, il n'existe pas de thermophiles au sens de la définition donnée plus haut et s'appliquant à des organismes vivant à des températures supérieures ou égales à 60 °C. Ainsi la levure thermophile *Candida thermophila* a une température maximale de 51°C et croit à l'optimum pour des températures de 30-35 °C. *L'amibe Echnimamoeba thermanum* se développe optimalement à 50°C, et il s'agit sans doute là d'un des *Eukarya* les plus thermophiles (Daniel ,2014).



**Figure N2 :** Arbre phylogénique simplifié des Eukarya (D. Prieur, Geslin C. et Payan C., Mini manuel de microbiologie, Dunode).

**4.3. Les archaea :**

C'est dans le troisième domaine du vivant les *Archaea*, que l'on rencontre les organismes les plus étonnants, en ce qui concerne au moins les thermophiles. Avant la découverte par Carl Woese de l'organisation du monde vivant en 3 domaines, les *Archaea* étaient représentées (sans que leur spécificité phylogénétique soit reconnue) par des halophiles extrêmes, et des méthanogènes (Danial.,2014)



**Figure N3 :** Arbre phylogénique simplifié des Archaea .(D.Prieur, Geslin C. et Payan C., Mini manuel de microbiologie, Dunod, Paris 2011)

Le genre *Sulfolobus* se situe dans la branche des *Crenarchaeota*. *Sulfolobus Solfataricus* décrit en 1972 par Thomas Brock qui l'avait isolé de sources chaudes acides du parc national de Yellowstone. Cette espèce vit dans une gamme de température allant de 55 à 90 °C avec un optimum d'environ 75 °C. Ce hyperthermophile est aussi un acidophile vivant dans des gammes de pH allant de 0.9 à 5.8. C'est un chimolithotrophe aérobique qui oxyde l'hydrogène sulfuré et le soufre élémentaire en acide sulfurique, en présence d'oxygène. Une douzaines d'espèces aux propriétés très proches ont depuis été décrites. Chez les *Sulfolobales* se trouve également le genre *Acidianus* isolé de diverses sources chaudes des USA, d'Islande ou d'Italie (Daniel.,2014)

### **- Euryarchaeota**

L'autre branche majeure des *Archaea* est celle des *Euryarchaeota* où se situent les halophiles extrêmes, et les méthanogènes dont il existe des représentants thermophiles. On rencontre également chez les *Euryarchaeota* des thermophiles acidophiles. Ils appartiennent à la lignée des *thermoplasmatales* et sont représentés par les genres *Thermoplasma*, *ferroplasma* et *Picrophilus thermoplasma* et *Ferroplasma* ont la particularité de ne pas posséder de paroi cellulaire (Daniel.,2014).

## **5. 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).

### **5.1. Biotopes naturels**

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

#### **❖ Biotopes marins**

Les biotopes marins des thermophiles sont les systèmes hydrothermaux localisés dans les zones côtières, les profondeurs abyssales, et au niveau des montagnes sous-marines actives comme Teahicaya et Macdonald en Polynésie (Huber *et al*, 2000). Ces écosystèmes sont caractérisés par de fortes concentrations en sel (environ 3%, p/v), et par des valeurs de pH variant de faiblement acides à faiblement alcalines (pH 5,0-8,5). Dans les zones volcaniques

actives, de grandes quantités de vapeur contenant du dioxyde de carbone, du sulfure d'hydrogène et des quantités variables d'hydrogène, de méthane, d'azote, de monoxyde de carbone et des traces d'ammonium et de nitrate sont produites (Huber *et al*, 2000). De plus, les composés soufrés majeurs présents dans les zones marines chaudes sont le soufre, le thiosulfate et le sulfate. Il existe des systèmes hydrothermaux côtiers dans plusieurs régions du monde : Italie, Açores, Indonésie, Islande, etc. (Huber *et al*, 2000).

### ❖ 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 98°C. 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, certaines sources Chaudes dépassent parfois les 50°C (Saibi, 2009).

## 5.2. 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).

## **6. Les Bases moléculaire des thermophiles**

les thermophiles ont subis de nombreuses adaptations physiologiques et biochimiques qui maintiennent l'intégrité et la fonction de leurs cellules (Antranikian *et al.*, 2005 ; Ferrera et Reysenbach, 2007).

### **6.1. Les lipides**

L'étude de la composition des lipides membranaire indique des différences d'adaptation au thermophile entre les archaea et les bactéries. Les lipides membranaires des archées comportent des liaisons éther alors que ces liaisons sont généralement de type ester chez les bactéries et les eucaryotes. Toutefois, un nouveau type de lipides de glycérol à liaison éther a été identifié chez les bactéries hyperthermophile *Thermotage maritima* : l'acide 15,16 diméthyl-30-glyceryloxlaisoney-triacontanedioïque. Les liaisons éther sont plus résistantes que les liaisons ester aux effets de la température, à l'oxydation et à la dégradation enzymatique. De plus les archées possèdent des diphytanyl-glycérol : les deux chaînes d'acides gras issues de chaque molécule de glycérol sont liées par des liaisons covalentes créant une structure membranaire en monocouche lipidique. Cette structure, largement répandu chez les archaea hyperthermophiles est beaucoup plus rigide que les bicouches lipidique des bactéries. Les stratégies de conservation de la structure membranaire à température élevée implique chez les bactéries une augmentation du degré de saturation et de la longueur des chaînes d'acides gras et chez les archées une cyclisation des chaîne d'acide gras et une transition de lipides à liaison diéther en lipides à liaisons tétraéther, ce qui contribue à une meilleure adaptation aux température élevée par réduction de la fluidité membranaire ( van de Rosenberg et al.1998).

### **6.2. Les acides nucléiques**

Les archées hyperthermophiles possèdent une gyrase inverse ADN topomérase ce qui introduit des super tours positifs dans l'ADN et qui contribue à stabiliser la double hélice d'ADN et a la préserver de la dénaturation thermique. Les gyrases inverses ont été détectées uniquement chez les microorganismes qui ont une température optimale de croissance de plus de 65 C°, et sont présentent sans exception chez les archées et les bactéries dont la température optimale de croissance sont supérieur à 80 C°. Ce super-enroulement pourrait maintenir les paramètres structuraux et thermodynamique de l'ADN à des valeurs similaires à celles des mésophiles (Ferrero et al. 1996).

### **6.3. Les protéines**

Il semble qu'il n'existe pas de mécanisme universel expliquant la thermo stabilité des protéines chez les microorganismes thermophiles, mais plutôt plusieurs facteurs intervenant à différent niveau selon les microorganismes considérés. La composition en acides aminés des protéines thermostable issus d'hypertermophiles ne présente pas de particularité notable. La désamination des chaînes latérales des acides aminés glutamines et asparagine et les clivages des ponts disulfures apparaissent au delà de 80 C°. Le repliement des protéines semble être un facteur essentiel de thermo stabilité. Certaines propriétés communes à la protéine thermostable ont été observées :

- une faible surface d'exposition aux solvants.
- une augmentation de l'hydrophobicité du centre de la protéine ce qui diminue probablement le risque de dépliement.
- une diminution de la longueur des boucles superficielles.
- la présence des liaisons hydrogène entre les résidus polaires et d'avantages de liaisons ionique en surface. (Holden, 2009 ; Quérellou et Guézennec, 2010).

Les travaux de recherche sur les extrêmophiles et spécialement les thermophiles 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).

### **1. Applications basées sur les cellules entières**

Il s'agit d'applications qui requièrent l'action directe d'une population microbienne, voire d'un mélange complexe de différentes espèces. Parmi les applications des thermophiles

#### **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. Parmi les archées réductrices de fer, *Pyrobaculum islandicum* et *Pyrobaculum furiosus*, ont la capacité de transformer le chlorure d'or en or insoluble. Alors que les acidothermophiles comme *Sulfolobus metallicus* et *Metallosphaera sedula* sont utilisées dans l'extraction du cuivre à partir de minéraux sulfuré ou encore dans le traitement de certains minerais sulfurés tels que la pyrite. La manipulation et la réutilisation des pneus épuisés posent de sérieux problèmes et le recyclage des matériaux en caoutchouc est préférable d'un point de vue économique et environnemental. L'espèce *Pyrobaculum furiosus* est capable de désulfurer le caoutchouc en donnant un produit avec de bonnes propriétés mécaniques (Bredberg *et al*, 2001).

#### **1.2 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).

Des hydrogénases archéennes ont été la cible de recherche intensive. Une NiFe hydrogénase cytoplasmique issue de l'hyperthermophile *Thermococcus kodakaraensis* est active de façon optimale à 90°C pour la production d'hydrogène avec le méthylviologène .

La même enzyme membranaire est identifiée chez la bactérie *Thermotoga tengcongensis* et autres membres de l'ordre des *Thermotogales* (Kadar *et al*, 2003).

### **1. 3 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).

## **1.2. Applications basées sur les biomolécules**

### **1.. Enzymes**

, Les procaryotes thermophiles et hyperthermophiles constituent une source d'enzymes supérieures aux biocatalyseurs traditionnels par leurs propriétés uniques : thermostables, thermoactives. Leur exploitation a mené à l'élaboration de produits de haute valeur, utilisés dans les industries chimiques, pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires, de papiers et de textiles. Les thermophiles ont également révolutionné la biotechnologie avec leur exploitation dans différentes applications comprenant la synthèse des acides nucléiques, des acides aminés et l'étude des structures protéiques (Antranikian, 2008).

### **1.1. Enzymes de dégradation et de modification des polysaccharides**

#### **- Enzymes dégradant la pectine**

La dégradation enzymatique de la pectine est largement appliquée dans des processus de technologie alimentaire, comme dans l'extraction des jus de fruit et la fabrication de vin, afin d'augmenter le rendement en jus, de réduire sa viscosité, d'éclaircir sa couleur. (Antranikian, 2008).

La pectine est présente dans la partie intermédiaire des parois cellulaires végétales. Ce bio polymère est un hétéro polysaccharide ramifié se composant d'une chaîne principale de  $\alpha$ -1,4-D-polygalacturonate partiellement méthyles.

La pectine est dégradée par des enzymes pectinolytiques classées en deux grands groupes : les méthylestérases, dont la fonction est d'éliminer les groupes méthoxy, et les dés polymérasés (hydrolases et lyases), qui attaquent la pectine et le pectase (acide polygalacturonique). La production de telles enzymes n'a été rapportée que chez les bactéries anaérobies thermophiles. Ces enzymes agissent habituellement à pH alcalin et ont besoin d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### - **Enzymes modifiant l'amidon**

L'industrie de la transformation de l'amidon en produits plus précieux tels que les dextrines, le glucose, le fructose, le maltose, et le tréhalose, utilise les enzymes thermostables microbiennes. Dans tous les processus de conversion de l'amidon, des températures élevées sont requises pour liquéfier l'amidon et le rendre accessible à l'hydrolyse enzymatique (Antranikian, 2009).

Les enzymes amylolytiques sont également employées dans l'industrie du textile, du papier et en panification (Gomes et Steiner, 2004)

Des préparations commercialisées d' $\alpha$ -amylases (EC 3.1.1.1) issues de souches thermophiles de *Bacillus*, et d'archées hyperthermophiles agissant à des températures supérieures à 100°C, sont utilisées pour la liquéfaction de l'amidon et le désencollage des textiles (Ponzano *et al.*, 2011).

### **2.2.. Protéases**

Les protéases sont impliquées dans la conversion des protéines en acides aminés et en peptides. La plupart des protéases des archées et des bactéries thermophiles appartiennent au type sérine, et sont stables à températures élevées et en présence de concentrations élevées de détergents et d'agents dénaturants.

des protéases thermostables résistantes aux agents tensio-actifs anioniques ou non ioniques actives à des températures supérieures à 60°C trouvent leurs applications comme composantes des détergents de vaisselle (Banerjee *et al.*, 1999 ; Niehaus *et al.* 1999).

En raison de leur compatibilité avec les conditions opératoires, des protéases thermoactives sont utilisées dans certaines techniques de biologie moléculaire, tels que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et le séquençage de l'ADN (Vieille et al., 2001).

### **1.3. Enzymes de manipulation des acides nucléiques :**

-Le succès commercial des enzymes thermostables se confond d'ailleurs encore aujourd'hui avec l'avènement de la **PCR** (Polymérase Chain réaction ou réaction en chaîne par polymérase), une technique d'amplification génique très puissante désormais courante en biologie moléculaire.

-Moins d'un an après les premières réactions, l'ADN polymérase d'*E. Coli* alors utilisée fut remplacée par *Thermus aquaticus* ou *Taq* polymérase (thermophile issue des sources chaudes du parc de Yellowstone), une enzyme thermostable. Ce choix repose bien sûr, sur l'aptitude de cette nouvelle enzyme à résister à la chaleur.

### **1.4 Autres enzymes**

De nombreuses autres enzymes issues des thermophiles présentent un intérêt biotechnologique potentiel.

- cytochromes P450 oxydoréductases (EC 1.6.2.4) effectuent le transfert d'électrons aux cathodes dans les piles à combustibles ;
- les hydroxylases aromatiques (EC 1.14.13.) produisent des composés phénoliques réactifs à partir de substances aromatiques ;
- les nitrilases (EC 3.5.5.1) : dans la conversion de nitriles en acides carboxyliques la
- la  $\beta$ -galactosidase thermostable de *Pyrococcus woesei* est potentiellement utilisable dans la préparation du lait dé lactose et d'autres produits laitiers

### **1.5 Lipides**

Les archéobactéries thermophiles possèdent notamment une membrane lipidique et une paroi cellulaire hors du commun. De quoi intéresser le milieu pharmaceutique et les sociétés spécialisées en cosmétologie. Ces lipides sont particulièrement intéressants dans la construction de liposomes thermostables (les liposomes sont de petites vésicules sphériques constituées par un assemblage lipidique, au sein desquelles on peut placer diverses molécules

qui se trouvent alors séparées du milieu externe). Pratique donc pour réaliser des suspensions stables et homogènes qui véhiculent divers principes actifs.

Les liposomes peuvent ainsi véhiculer des médicaments dans l'organisme (vaccins,...). Ils peuvent également être utilisés en cosmétologie. Dans ce domaine, de nombreuses substances (antioxydants, collagène, etc.) sont en général appliquées localement sous forme d'émulsion huileuse ou de solution alcoolique

Généralement les archaéosomes (liposomes des archées) montrent une stabilité plus élevée aux stress oxydatif et thermique, aux pH alcalins, à l'attaque des phospholipases, et aux protéines sériques.

D'autres avantages sont liés à l'utilisation de micro-organismes Thermophiles :

- L'augmentation de la température accroît le taux de diffusion et la solubilité des composés non gazeux et diminue la solubilité des composés gazeux (oxygène, hydrogène, méthane...).
- 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.
- Les contaminations des milieux de culture par les différents phages ou bactéries parasites sont moins fréquemment observées dans les fermentations menées à hautes températures, le spectre des micro-organismes supportant de telles températures étant moins vaste.

-Toute la partie expérimental a été réalisées au niveau du laboratoire de l'analyse de l'eau de département de Biologie à l'université de Guelma 8 MAI 1954.

#### **Matériel :**

L'ensemble des milieux de culture, réactifs, appareillages seront cités au fur et à mesure de leurs utilisations (Multi paramètre HI9829 ,PH indicateur papier L=5m)

#### **Méthodes:**

##### **1-Echantillonnage :**

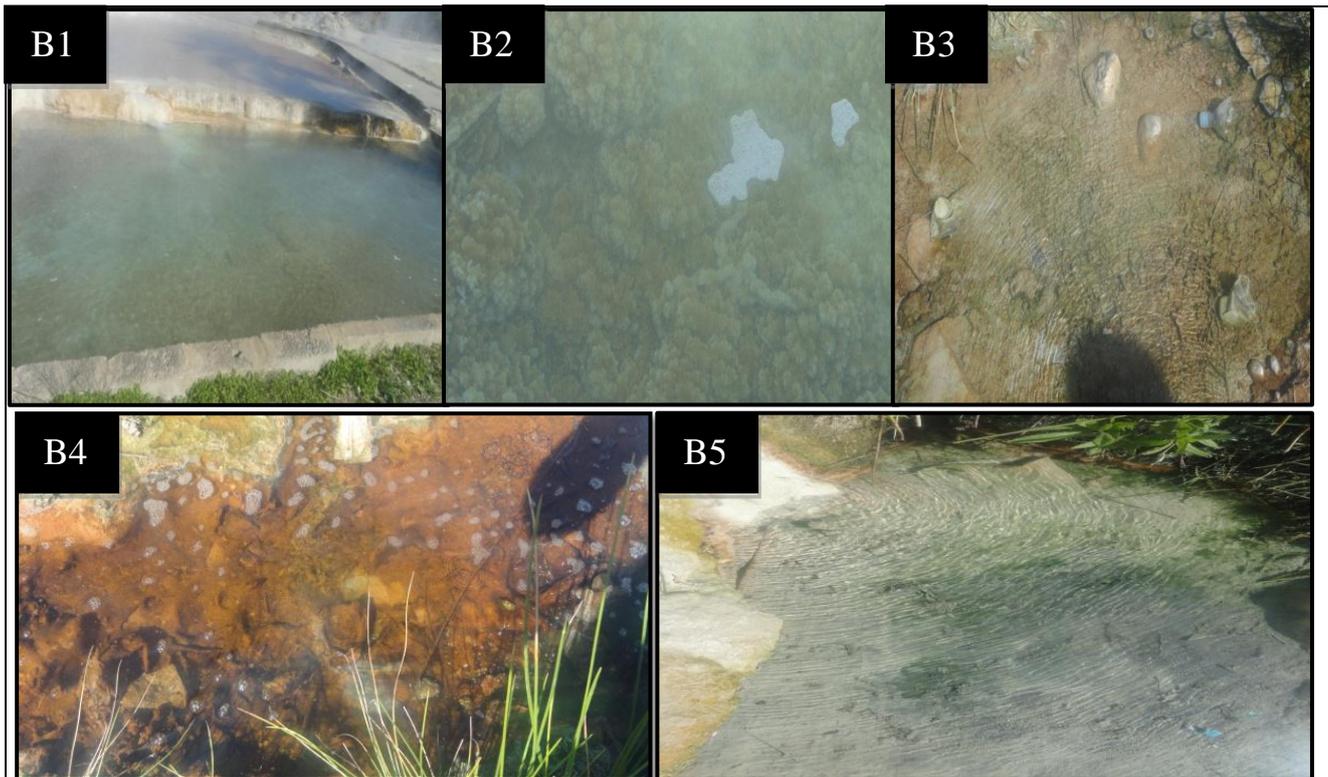
##### **1-1présentation le site d'étude « Hammam Debagh (Meskoutine) « Guelma» :**

Hammam Meskoutine (Fig.) est situé à l'Est Constantinois, à 110 Km de Constantine et 20 Km de Guelma, son site qui se trouve à 320 mètres d'altitude est particulièrement surprenant au sein de collines et montagne boisées, a proximité de cascades solidifiées a l'aspect lunaire. La source de hammam Meskoutine est la plus florissante de l'Algérie et ses eaux sont les plus chaudes. Il existe neuf sources hyperthermales dont la température de l'eau varie entre 90 et 98°C.

Les eaux sont d'une nature saline, avec une odeur sulfureuse, leurs faciès chimique est bicarbonaté calciques, chloruré sodique, radioactives, avec dégagement d'hydrogène sulfuré. (OUALI, 2008).



**Figure 5:** Localisation de site d'étude: Hammam Debagh —Guelma



**Figure N6 : Vue général des bassins de prélèvements (photo précise avec une  
appareille photo numérique Sony)**

- Données physico-chimique de la source thermale:

Caractéristiques physico-chimiques de la source chaude (Bassin 1, 2, 3, 4,5)

- Les mesures in situ : la température, le pH, l'oxygène et la conductimètre, respectivement à l'aide D'un thermomètre manuel, et des bandelettes de pH , *et appareille de multi paramètre*. Les mesure du pH, oxygéné, conductimètres est revérifié au laboratoire par *la appareille MULTiparameter (HI 9829)*.

**Tableau N 01: Les caractéristique physico – chimique de la source thermale**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>O2</b>	44				42
<b>CONDUCTIMITRIE R</b>	2.12ms/cm A T=55c°	2130us/cm A T=60c°	2015us/cm	2203us/cm	2166us/cm
<b>SALINITER</b>	1 a T=50c°				
<b>PH</b>	7.87	7.70	7.79	6.65	7.77
<b>T°</b>	55.5 c°	60 C°	50 C°	53.4 C°	52.5 C°
<b>TURBIDITER</b>	17.4 NTU*	1.81 NTU*	0.59 NTU*	1.20 NTU*	5.80 NTU*
<b>POTONTIELLE Red/ox</b>	-41.4 mV pH	-31.5 mV pH	38.5 mV ph	28.1 mV pH	-37.6 mV ph
<b>Pression</b>	14.068 Psi	14.066 Psi	14.069 psi	14.065 psi	14.06 psi

### **1.2. Technique de prélèvement :**

- Les échantillons ponctuels ont été effectuées au niveau de cinq points distinct (bassins) nommées B1, B2, B3, B4 et B5. La méthode de prélèvement manuelle consiste a plongé directement le récipient de prélèvement (flacons en verre de 250 ml stérile) sur une profondeur de 15 cm de la surface à l'aide d'une pince télescopique.

Pour respecter les conditions d'asepsie les flacons ont été rempli en prenant soin de ne pas toucher l'intérieur du flacon, du bouchon et le filetage.

### **1.3. Transport et conservation des échantillonnes :**

Les échantillons prélevés sont clairement identifiés. Chaque flacon a porté une étiquette indiquant : le numéro du point de prélèvement, date et heure. Puis tous les prélèvements sont transportés dans une glacière dont la température est comprise ente 4 à 6 c°.

## 2-Recherche des bactéries antibiorésistantes dans les eaux de Hammam de Debagh

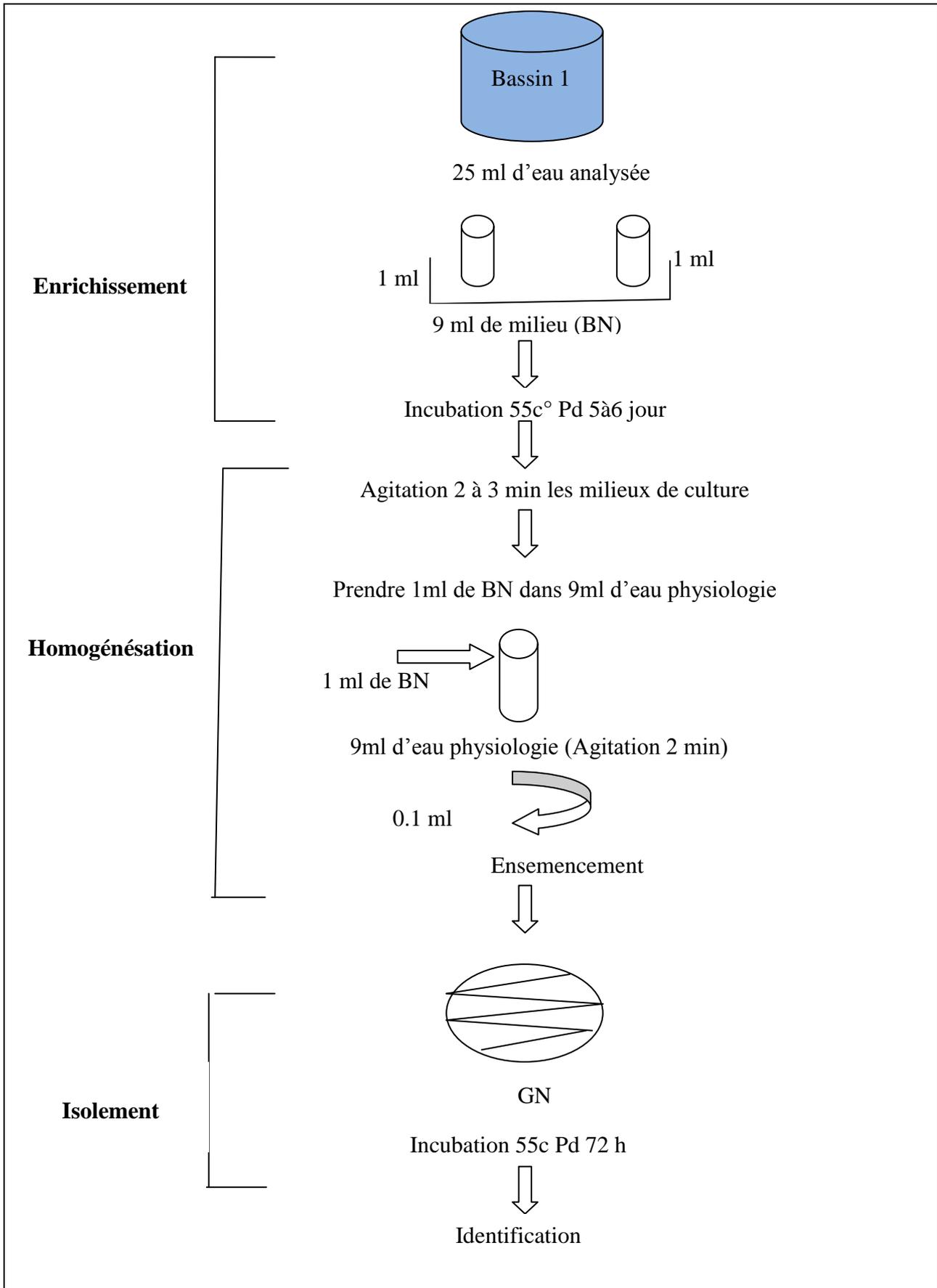
### **2-1 Isolement et identification de bactérie**

#### **- Enrichissement**

1 ml des différents échantillons d'eau ont été mis dans 9ml de bouillon nutritif (BN), ensuite incubé à 55°C jusqu'à l'apparition d'un trouble (72 à 96 heures). Cette étape favorise la réparation des bactéries stressées et permet de rétablir ainsi leur capacité à former des colonies.

#### **- Isolement**

Ensemencement en stries ascendantes, à l'aide d'une anse de platine, d'une série de tubes contenant de la gélose nutritif incliné. Tous les tubes sont mis à l'étuve ou Bain Marie pendant 72 à 96 heures à 55 °C.



**Schéma 01 : Isolement des bactéries thermophile**

- **conservation des isolats:**

Les souches pures présentant des aspects différents ont été conservées sur gélose nutritive inclinée à 4°C pour une durée de trois mois et sur des tubes eppendorff contenant du BN additionné de 1 5 %(v/v) de glycérol stérile à 0°C pour une conservation à long terme

**B-Identification:**

➤ **Examen macroscopique:**

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer Une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. D'après les auteurs Thomas et al. (1970), les éléments d'identification macroscopiques sont :

- La forme des colonies : rondes, irrégulières,...etc.
- La taille des colonies par la mesure du diamètre : pinctiformes
- couleur de la colonie.
- L'élévation : convexe, concave, plate.
- L'opacité : opaque, translucide ou transparente.
- La surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée,...etc.

➤ **Examen microscopique:**

**1-Coloration de Gram:**

La **coloration de Gram** doit son nom au bactériologiste danois **Hans Christian Gram** qui mes 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-. Cette information est importante car elle est utilisée dans la taxonomie. Elle permet ainsi, avec la reconnaissance de la morphologique et le mode de groupement des bactéries de renseigner sur l'ordre dont fait partie les bactéries étudiées [1]

### **Préparation du Frottis :**

- On réalise un frottis sur une lame de microscope à partir d'une suspension bactérienne. Avec l'aide d'une anse que l'on aura préalablement stérilisé (en la passant sous le bec benzène), on prélève un peu de la solution bactérienne en plongeant le fil de platine de la anse dans le tube à essai.
- On dépose ensuite ce prélèvement au milieu de la lame en faisant des rotations jusqu'à séchage.
- On procède à la fixation du frottis on passant directement 3 fois la lame dans la flamme du bec Bunsen.
- La coloration au violet de Gentiane (colorant basique): la lame est plongée pendant 2 à 3 minutes (en fonction de la concentration) dans la coloration au violet de gentiane. Toutes les bactéries sont colorées en violet puis rincer à l'eau déminéralisée.
- Mordançage au lugol (solution iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir 20 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.
- Décoloration à l'alcool: verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Rincer sous un filet d'eau déminéralisée. L'alcool pénètre dans la bactérie. La coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.
- Contre coloration avec de la Fuchsine ou de la Safranine: laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame avec du papier absorbant. Les bactéries Gram- sont colorées en rose.

### **➤ Identification biochimique :**

L'identification biochimique est un examen qui permet d'identifier une bactérie en s'appuyant sur ces caractères biochimiques.

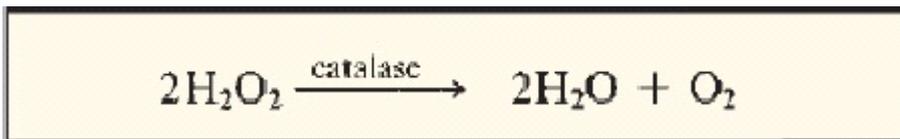
Les galeries d'identification biochimique permettent une identification rapide des bactéries.

**- Recherche des enzymes respiratoires:**

**1- Catalase**

**- Principe:**

La catalase est une enzyme présente chez la plus part des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante (Marchal et Bourdon, 1982)



**- Technique:**

Prendre une lame porte objet propre. Déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes et émulsionner un peu de la colonie suspecte ou de la culture obtenue sur gélose.

**- Lecture:**

**Catalase positive :** dégagement immédiat de bulles de gaz.

**Catalase négative :** absence de dégagement de bulles de gaz [2]

**2- Mannitol mobilité :**

Ce milieu permet l'étude de la fermentation du mannitol, la mobilité de la souche et la recherche de la nitrate réductase

**- Principe**

- La présence d'une faible teneur d'agar (gélose semi-molle) rend possible le déplacement des Bactéries mobiles autour de la piqûre centrale.

-La lecture de l'utilisation du mannitol est possible grâce à la présence d'un indicateur de pH, le rouge de phénol. L'utilisation du mannitol acidifie le milieu qui peut ainsi être révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune).

-La présence de nitrate de potassium permet la recherche de la nitrate réductase.

## **-Technique d'ensemencement**

Ensemencer le milieu mannitol-Mobilité par piqure central à l'aide d'une pipette Pasteur fermée. Incuber à 37°C pendant 24h

### **- La galerie Api 20 E:**

La galerie API 20E comporte 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 spontanés ou révélés par l'addition de réactifs

### **-Technique :**

#### **- Préparation de l'inoculum :**

Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de Suspension Medium ou dans un tube D'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu L gélosé.

#### **- Inoculation de la galerie :**

Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne.

Remplir uniquement les tubes des autres tests.

Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en remplissant leur Cupule d'huile de paraffine.

Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures.

#### **- Lecture :**

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification ou grâce à un logiciel d'identification.

La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (Voir Annexe2

Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1,2 ou 4) est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque group les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre 7 chiffres qui sert de code d'identification (GUIRAUD, 2003).

Le code numérique obtenue permet d'identifier la souche étudiée en se référant au catalogue analytique soit avec une logicielle d'identification. [3]

### **Lecture :**

- Mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibitions à l'aide d'un pied à coulisse.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories résistante et irrésistance.

-Remarque : Comme témoins nous avons utilisés des souches de références :

*E. coli* ATCC 00000000

*Staphylococcus aureus* ATCC 000000

### **- Mise en évidence des enzymes extracellulaires**

Les isolats sont soumis à une recherche de différents enzymes extracellulaires à 55°C pendant 1 à 2 jours.

### **7.1. Détermination de l'activité amylolytique**

La présence de l'activité amylolytique est déterminée par l'ensemencement des souches sur gélose à amidon (annexe). Après incubation, les colonies sont recouvertes par une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour des colonies, par contre les zones contenant de l'amidon se colorent en brun (Fooladj et al, 2010).

### **7.2. Détermination de l'activité protéolytique**

La dégradation de caséine est déterminée par l'ensemencement des souches sur gélose au lait (annexe). La présence de cette activité est détectée par la formation d'un halo clair autour des colonies (Roxana *et al*, 2009).

### **7.3. Détermination de l'activité lipolytique**

#### **7.3.1. Hydrolyse de Tween 80**

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

### **- Activité antimicrobienne des souches isolées**

La mise en évidence de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode des disques ; Ces activités a été testée vis-à-vis de bactéries tests: Escherichia coli et Staphylococcus aureus.

### **- Préparation des souches tests**

La culture des germes tests utilisés, Escherichia coli et Staphylococcus aureus, pour la mise en évidence du pouvoir antimicrobien a été réalisé sur BN liquide pendant 18 à 24 h à 37°C. Par la suite, les suspensions bactériennes ont été préparé pour obtenir une densité optique comprise entre 0,08 et 0,1 à une longueur d'onde  $\sigma = 620$  nm (turbidité équivalente à 0,5 McFarland).

### **-Technique des cylindres**

Après ensemencement de souches microbiennes isolées sur le milieu BN, et incubation pendant 96 h à 55°C, le milieu est centrifugé à 6000 t/min pendant 15 minutes. Le surnagent est récupéré dans un tube stérile par la suite des disques de papier wattman de 6 mm de diamètre sont misent en contact avec les surnagent. Les disques de papier ainsi imprégné sont ensuite déposés à la surface du milieu Mueller Hinton préalablement ensemencés par écouvillonnage avec les germes tests. Les boites de Pétri portant les cylindres sont placées à température ambiante pendant une heures pour permettre une pré diffusion des substances bioactives élaborées par nos souches, puis incubées pendant 24 heures à 37 °C.

### **- Isolement et purification des isolats :**

-Après incubation de 72 à 96 heures à 55°C des tubes contenant du bouillon nutritif (BN) et les autre tube de milieu minimax synthétique qui sont inoculé par les échantillons d'eau il ya une trouble bien apparue.

-un ensemencement est réalisé sur gélose nutritive.

Plusieurs colonies qui sont apparues après 4 à 7 jours d'incubation sur gélose nutritif (GN) à 55°C présentant des aspects microscopiques et macroscopiques différents, et après la purification, dix isolats (BN01, BN02, BN03, BN04, BN05, MN01, MN02, MN03, MN04, MN05) qui ont une forme bâtonnet, Gram négative et Gram positif, sont sélectionnées pour l'identification.

## 2- Identification phénotypique des isolats

### 2.1- les caractères microscopiques et macroscopiques des isolats :

Toutes les souches sélectionnées sont des bactéries à des aspects différents.

**Tableau N°2** : Aspects macroscopique et microscopique des souches sélectionnées

<b>SOUCHE</b>	<b>Aspects macroscopique</b>	<b>Aspects microscopique</b>
<b>BN 01</b>	Il ya 2 type : - grande colonie bombé lisse et de borde régulier de couleur marron crème. - et on face des petites colonies lisse de couleur crème.	Se sont des bacilles de couleur violet de Gram positive
<b>BN 02</b>	- Une seul type de colonie a qui ressemble de la colonie plate avec des stigmates	Se sont des bacille de couleur violet à Gram positive
<b>BN 03</b>	Il ya 2 type : -Grande colonie a centre opaque de couleur crème et de borde irrégulier -grande colonie de centre opaque de couleur transparente et de borde irrégulier.	Se sont des bacilles de couleur rose à Gram Négative
<b>BN 04</b>	-Il ya des grandes colonies avec une centre opaque et de couleur crème et borde irrégulier	Se sont des bacilles de couleur rose à Gram Négative
<b>BN 05</b>		Se sont des bacilles de couleur violet à Gram positive
<b>MN 01</b>	-Se sont 3 types de colonie : grande colonie plate, grande colonie de couleur crème à ronde et lisse, grand colonie plate de couleur blanchâtre	Se sont des bacilles de couleur rose à Gram Négative

<b>MN 02</b>	il ya 2 type de colonie : -grande colonie de couleur crème avec de borde arrondie et lisse. -petite colonie de couleur transparente et de borde lisse.	Se sont des bacilles de couleur violet à Gram positive
<b>MN 03</b>	Il ya 2 type: -petite colonie de couleur transparente et de borde lisse -grande colonie de couleur transparent et de borde lisse.	Se sont des bacilles de couleur rose à Gram Négative
<b>MN 04</b>		Se sont des bacilles de couleur rose à Gram négative
<b>MN 05</b>	-Il ya des grandes colonies de couleur crème et des borde irrégulière.	Se sont des bacilles de couleur rose à Gram négative

➤ Aspect macroscopique

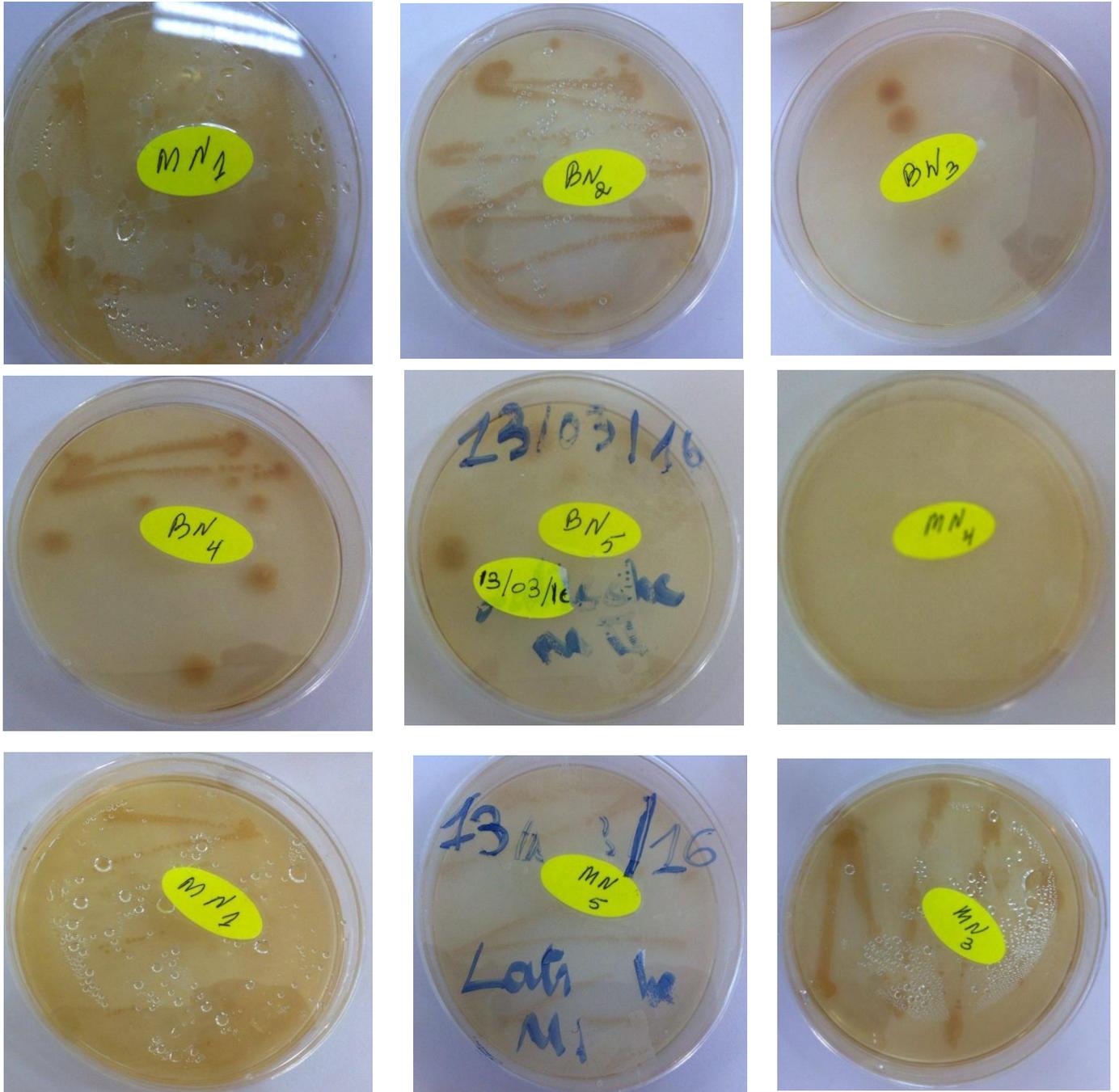
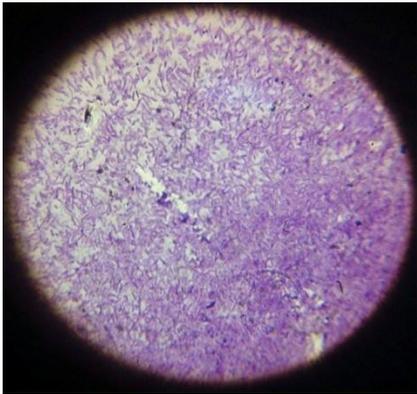
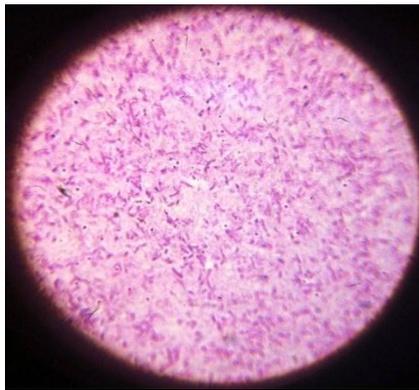


Figure N°7: Aspects microscopique des souches sélectionnées.

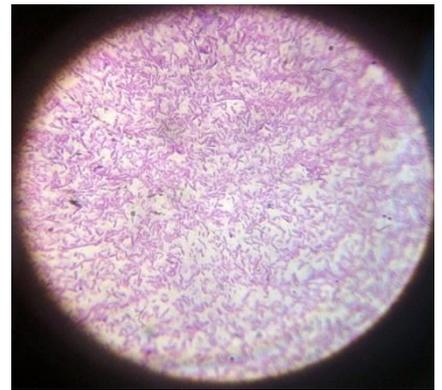
➤ Aspect microscopique



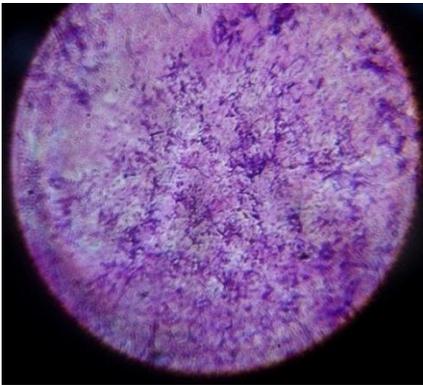
BN5



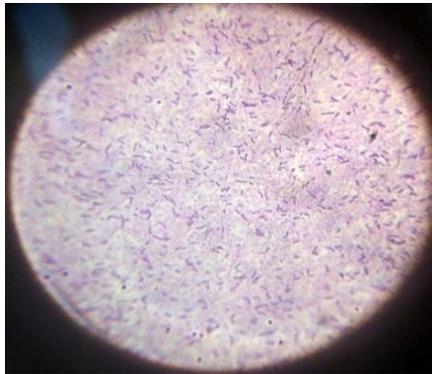
MN5



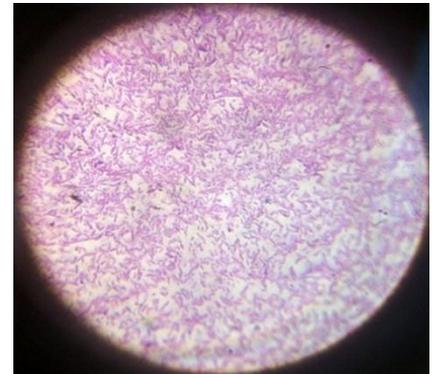
BN2



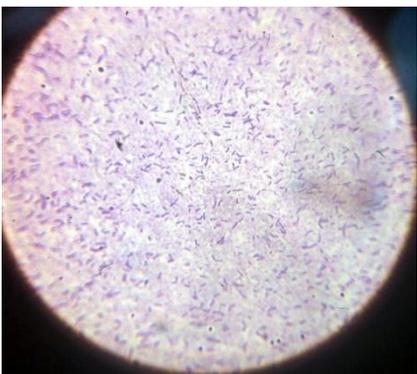
MN2



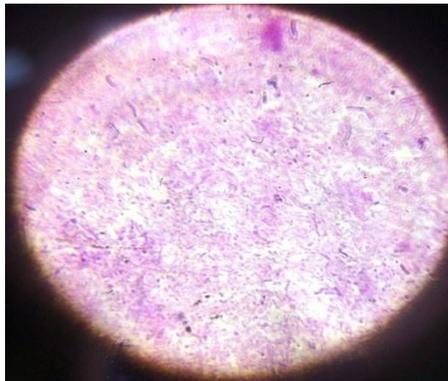
MN3



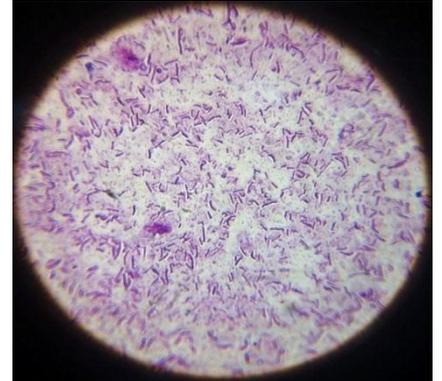
MN4



MN1



BN3



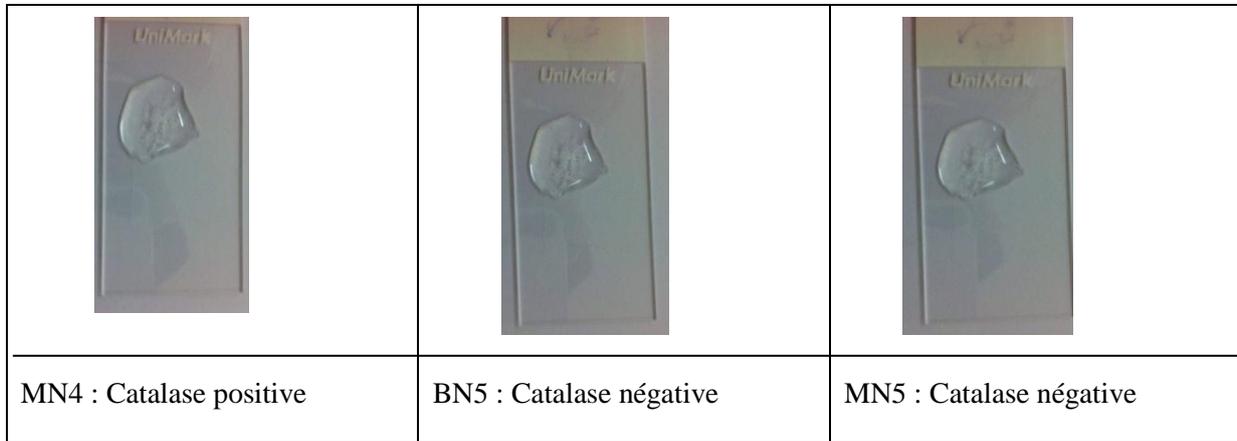
BN1

**Figure N°8 : Aspects microscopique des souches sélectionnées Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100)A. Photos prises avec un portable i Phone 4**

## 2.2- Identification biochimiques des isolat:

### - Catalase:

les trois souches étudiées sont catalase positive ,et négative

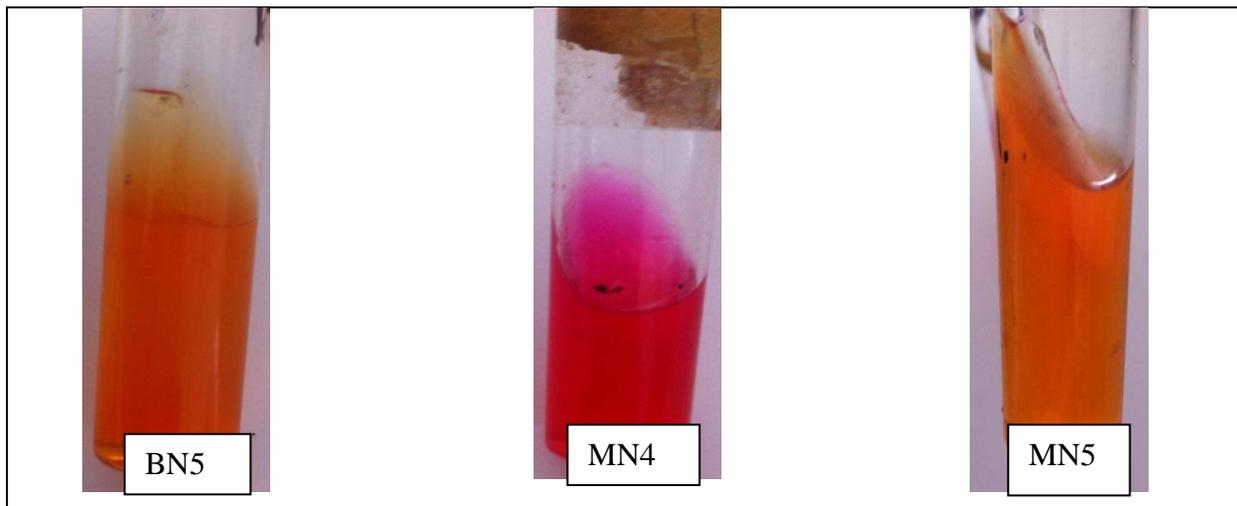


**Figure N°9:** résultat de catalase

### - Mannitol mobilité :

Un virage de l'indicateur au jaune a été observé, cela indique que les souches fermentent le mannitol (figure).

Les deux isolats BN5, MN4 sont mobiles sauf MN5 qui sont immobile selon le mannitol-mobilité



**Figure N°10 :** Résultat des cultures de trois souches BN5, MN4, MN5, sur le milieu Mannitol-mobilité

### 2.3- Résultats de la plaque API 20<sup>E</sup>:

Une galerie biochimique d'identification (API 20<sup>E</sup>, bio Mérieux) a été réalisée selon le mode opératoire décrit dans le prospectus

.Les galeries ont été incubés à 37°C pendant 24h, les résultats obtenues sont les suivants :



Figure N°11: Galerie Api20E, appliquée sur les milieux MN5 et MN4etBN5

**Tableau N°3 : Résultat de la plaque API 20E de BN5, MN5, MN4.**

<b>SOUCHE</b>	<b>BN5</b>	<b>MN5</b>	<b>MN4</b>
<b>ONPG</b>	-	-	-
<b>ADH</b>	+	+	-
<b>LDC</b>	-	-	-
<b>ODC</b>	-	+	-
<b>CIT</b>	+	+	+
<b>H2O</b>	-	-	-
<b>URE</b>	+	+	-
<b>TDA</b>	+	+	+
<b>IND</b>	-	-	-
<b>VP</b>	-	-	+
<b>GEL</b>	+	+	+
<b>GLU</b>	-	-	-
<b>MAN</b>	-	-	-
<b>INO</b>	-	-	-
<b>SOR</b>	-	-	-
<b>RHA</b>	-	-	-
<b>SAC</b>	-	-	-
<b>MEL</b>	-	-	-
<b>AMY</b>	-	-	-
<b>ARA</b>	-	-	-
<b>NO2</b>	+	-	-
<b>N2</b>	-	+	-

### **1- Mise en évidence des enzymes extracellulaires :**

La présence de ces activités hydrolytiques à été réalisée en utilisant les Substrats, amidon, caséine, tween 80. (Figure 10).

La production d'activités enzymatiques (amylolytique, lipolytique, protéolytique) a été observée chez la plus part des isolats étudiés (Tableau 0).

Toutes les souches ont hydrolysées l'amidon, tween 80, la lécithine et la caséine

**Tableau N° 4 : Résultats d'activités enzymatiques des isolats étudiées**

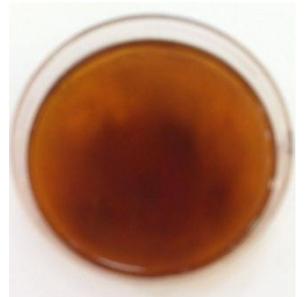
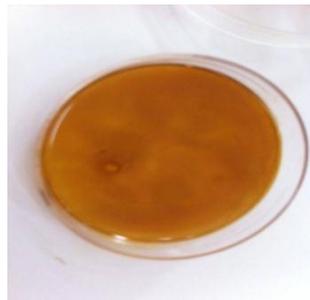
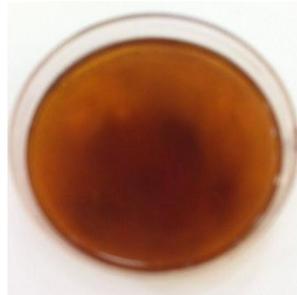
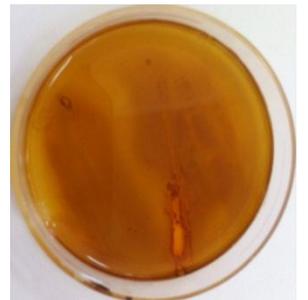
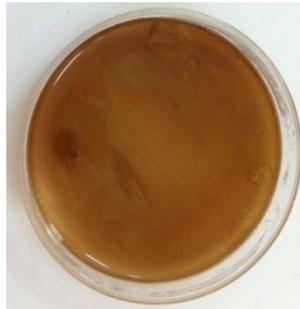
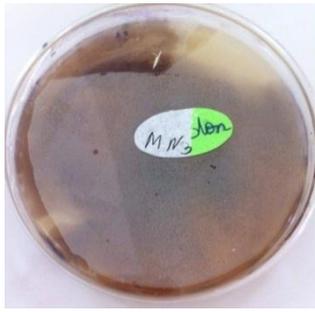
<b>Les souches</b>	<b>Tween 80</b>	<b>Amidon</b>	<b>caséine</b>
<b>BN 1</b>		-	+
<b>BN 2</b>		-	+
<b>BN' 3</b>		+	-
<b>BN 4</b>		+	+
<b>BN 5</b>		+	+
<b>BN3</b>		+	+
<b>MN 1</b>		+	-
<b>MN 1</b>		+	+
<b>MN 2</b>		+	-
<b>MN 3</b>		+	-
<b>MN 4</b>			
<b>MN'2</b>		+	+
<b>MN 3</b>			-

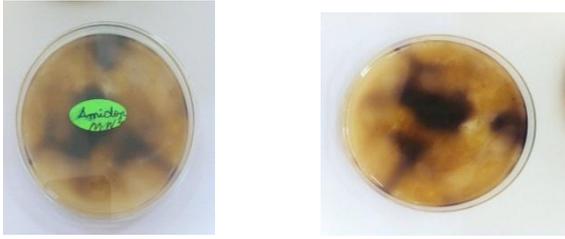
- **Remarque :**

(+) : hydrolyse complet

(-) : absence de l'hydrolyse

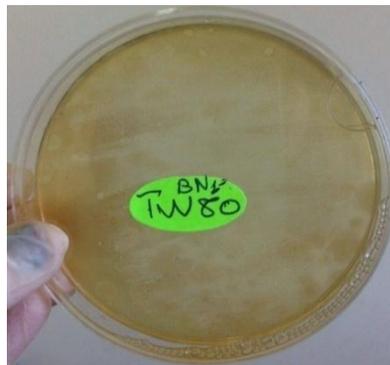
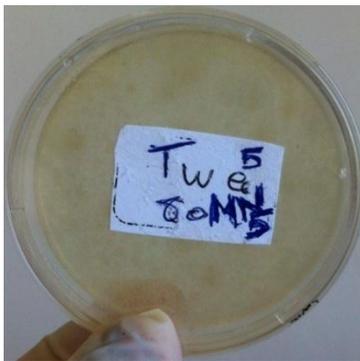
Les photos de l'amidon





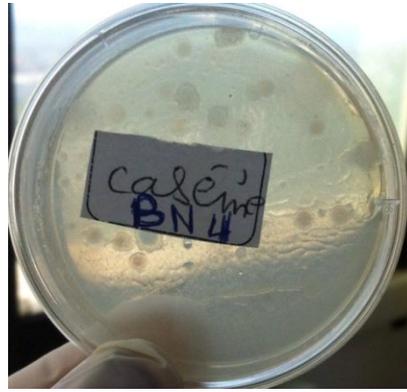
**Figure N°12** : Activités enzymatiques de Dégradation de l'amidon

- Photo de tween



**Figure N°13 : Activités enzymatiques de Dégradation du tween 80**

- Photo de caséine



**Figure N°14 : Activités enzymatiques de Dégradation du caséine**

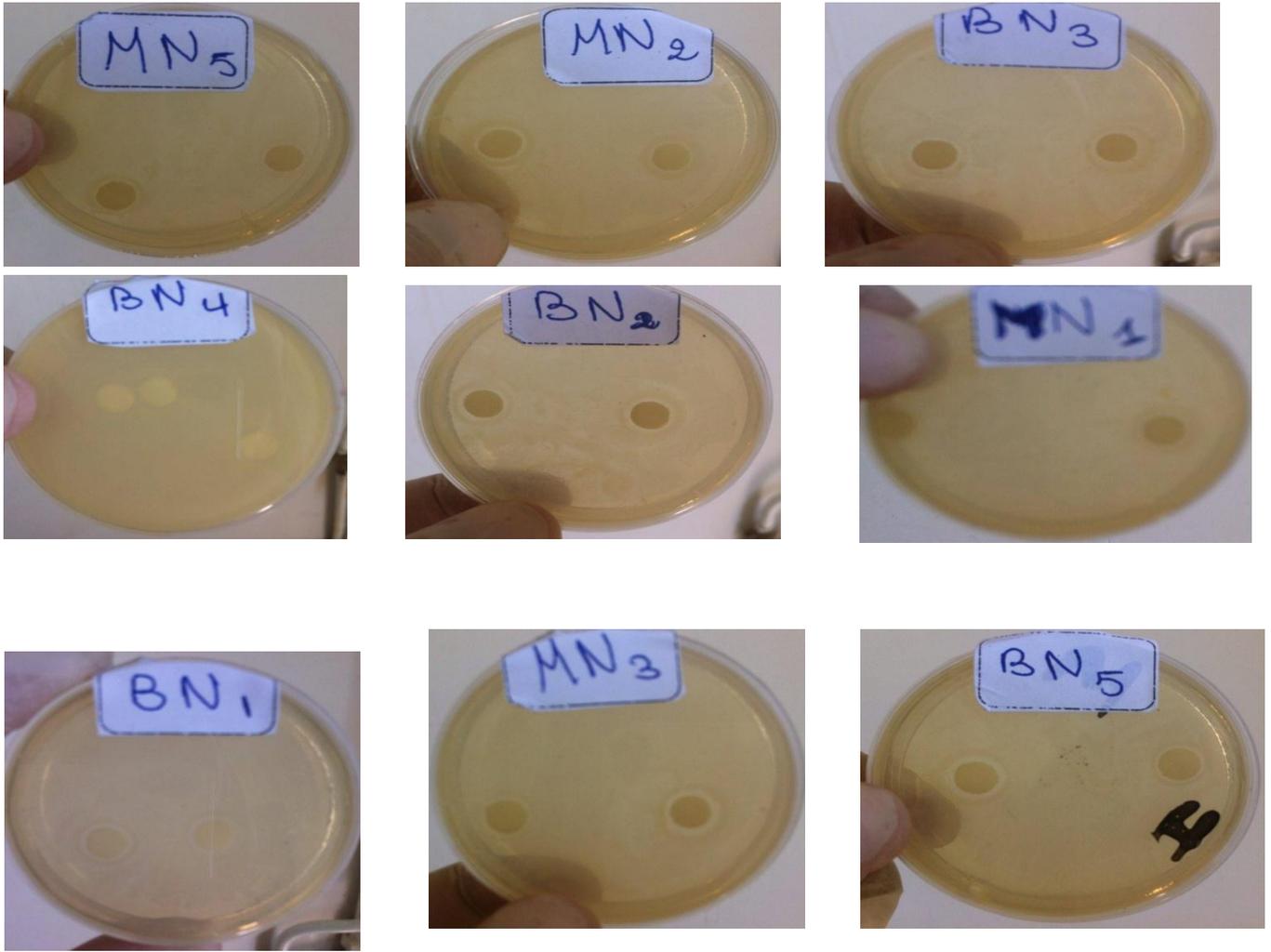
#### **4-Les test des antibiogramme:**

- dix souches sont choisies sur la base des résultats obtenus par la technique des cylindres d'agar pour tester leur activité antimicrobienne par la technique des puits (BN1, BN2, BN3, BN4, BN5, MN1, MN2, MN3, MN5)

-Les 14 surnageant des cultures des deux isolats choisis obtenus par centrifugation a été testé pour son pouvoir antimicrobien contre les germes test par la technique des puits.

**Tableau N°5 :** Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau.

<b>Souche</b>	<b>E coli</b>	<b>Straptococuuse</b>
<b>BN1</b>	/	9 mm
<b>BN2</b>	/	10 mm
<b>BN3</b>	7mm	9 mm
<b>BN3</b>	/	11 mm
<b>BN4</b>	/	12 mm
<b>BN5</b>	/	10 mm
<b>MN1</b>	/	10 mm
<b>MN2</b>	/	11 mm
<b>MN3</b>	/	12 mm
<b>MN5</b>	/	9 mm



**Figure N°15: les zones d'inhibition de la technique des cylindres d'agar**

## **La discision**

Cette étude réalisée sur des échantillons d'eau prélevés à partir de la source thermale de Hammam Dedagh (Guelma) avait pour objectif la mise en évidence des activités antimicrobiennes de ces microorganismes.

L'écosystème étudié dans ce travail a été choisi pour ses caractéristiques physiques et chimiques extrêmes. La source chaude de Hammam Debagh est la plus florissante de l'Algérie et ces eaux sont les plus chaudes (jusqu'à 98 °C) **(OUALI, 2008)**.

Cette étude a permis l'isolement de cinq souches

Ces caractéristiques phénotypiques distinguent la plus part des espèces thermophiles et hyperthermophiles isolées à partir des sources hydrothermales affiliées au genre *Bacillus* (Yuli *et al.*, 2004; Al-Quadani *et al.*, 2009 ; Fooladj *et al.*, 2010). Pour ces raisons et selon les critères de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (De Vos *et al.*, 2009), Nos isolats sont affiliés au genre *Bacillus* malgré que ce genre est un genre bactérien très complexe à identifier .

La plupart des isolats sont mobiles, catalase positive et forment des endospores, c'est le cas de la plupart des isolats bactériens aérobies et aéro-anaérobie facultatif thermophile et hyperthermophile (Nazina *et al.*, 2001 ; Khalil, 2002). Les milieux de culture ayant servis à leur isolement.

L'ensemble des isolats montrent une bonne croissance à 55 °C (en milieu liquide) et à **55°C** (en milieu solide). D'après ces résultats nous pouvons qualifier les souches étudiées comme thermophiles extrêmes en suivant la classification établie par **(Baker et al., 2001)**.

Les thermophiles ont, au cours de l'évolution, développé des stratégies adaptatives très variées. Ils présentent de ce fait un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans des conditions extrêmes, mais aussi de se développer souvent de manière optimale dans des niches écologiques extrêmes. Les propriétés singulières de certaines de ces biomolécules suscitent de ce fait l'intérêt des chercheurs (Guezennec, 2002). -les isolats sont producteurs d'enzymes hydrolytiques extracellulaires à une température élevée (à 55°C), ils sont dotés par des activités amylolytiques, protéolytiques, et lipolytiques.

Les *Bacillus* thermophiles et hyperthermophiles représentent une bonne source d'enzymes avec des avantages absolus, pour cela, ils sont les plus employés en biotechnologie **(Lagzian et al., 2012)**.

Les techniques utilisées pour le screening d'activités antimicrobiennes sont des

méthodes de diffusion en milieu gélosé (technique des cylindres d'agar et la technique des puits). Ces deux techniques sont les plus utilisées pour le criblage des biomolécules antimicrobiennes.

La technique est utilisée pour la mise en évidence des activités antimicrobiennes, c'est la technique des puits.

Le surnageant de cultures obtenues par centrifugation **à été testé** pour son pouvoir antibactérien contre les germes test.

Les résultats obtenus (tableau) montrent qu'une souche a présenté une activité vis-à-vis E.Coli ..seulement, par contre la deuxième souche (*Staphylococcus aureus* ATCC25923) présente une meilleure activité. La meilleure activité obtenue c'est vis-à-vis *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition 12 mm

Nous observons que le diamètre des zones d'inhibitions révélées varie entre les souches techniques ( la technique des puits), les bons résultats sont obtenus par la méthode des puits pour BN mn BN . Nous pouvons dire que le surnageant ne donne pas l'activité idéal,

Enfin, notre étude nous a permis de caractériser et identifier jusqu'au genre des microorganismes qui peuvent vivre dans une source thermique (milieu extrême) et montrer leur importance dans le domaine de biotechnologie par leur capacité de production des substances bioactives comme les enzymes et les antibiotiques.

## Conclusion générale

-Les extrêmophiles sont des microorganismes qui possèdent des possibilités d'applications dans plusieurs domaines, incluant l'agriculture, l'industrie, la pétrochimie et la bioremédiation des sols. Les microorganismes thermophiles se développant de façon optimale à des températures supérieures à 50°C, sont parmi les extrêmophiles les mieux étudiés, isolés de différents environnements, leurs enzymes extrêmement thermostables ont trouvés plusieurs applications à cause de leurs propriétés dépassant celles de leurs contreparties mésophiles.

-Dans les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles, le genre *Bacillus* est considéré parmi les principaux éléments dans le domaine de la biotechnologie grâce à sa capacité de produire et sécréter des différentes molécules et en grande quantité telles que les enzymes extracellulaires, les antibiotiques, les polysaccharides et d'autres molécules de nature diverse.

-Dans cette étude, un screening de quelques *Bacillus* extrêmophiles a été effectué à partir d'échantillons d'eau de la source thermale de Hammam Debagh (Guelma) (la température est de 95°C).

-Sept souches thermophiles ont été isolées de forme bâtonnet à Gram positif, forment des spores et possèdent la catalase. Elles sont biochimiquement différentes mais partagent quelques caractères.

-Ces souches étudiées ont la capacité de produire des différents enzymes extracellulaires importants industriellement (amylase, protéase, lipase) à partir de plusieurs substrats (Amidon, Caséine, Tween 80, Lécithine).

-Les résultats obtenus dans cette modeste étude ont un caractère novateur en effet aucune publication concernant le genre *Bacillus* isolé à partir de cette source thermale

