

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
تعاونية بلاديجه  
Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana  
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre  
Département de **Biologie**.



*Mémoire de fin d'études*

En vue de l'obtention de diplôme de **Master** en

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

**Filière**: Science biologique.

**Spécialité**: Microbiologie appliquée.

*Screening du pouvoir antimicrobien des micro-organismes isolés à partir  
de la source hydrothermale de Hamam Righa « Ain Defla ».*

Présenté par :

- *Ait Amrane Lemya*
- *Gueddoun Malika*
- *Benmerad Mohamed Amine*

*Devant le jury :*

<i>Mme.Helfaoui</i>	MAA	Présidente	(U.D.B Khemis Miliana)
<i>Mme.Didouh</i>	MCA	Promotrice	(U.D.B Khemis Miliana)
<i>Mme.Aiza</i>	MAA	Examinatrice	(U.D.B KhemisMiliana)

Année universitaire : 2021/2022

## **Remerciements**

*Nous remercions DIEU Le Tout Puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Nos remerciements les plus sincères vont à mesdames Didouh et Aissaoui pour leurs suivis et les précieux conseils qu'elles nous ont prodigués durant l'exécution et l'accomplissement de notre travail.*

*Nos vifs remerciements vont aux examinatrices pour avoir accepté d'examiner notre présent travail.*

*Un grand merci pour le personnel du laboratoire algérien des eaux, unité d'Ain Defla pour sa gentillesse durant notre stage ainsi que pour le personnel du laboratoire de microbiologie de l'université de Djilali Bounaama Khemis Miliana pour son aide et sa patience.*

*Nous remercions aussi le personnel de l'entreprise de la station thermale de Hammam Righa pour l'excellent accueil, l'instruction et l'aide dont nous avons bénéficié.*

*Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour leur générosité et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.*

*Enfin que toute personne qui a participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire soit sincèrement remerciée.*

## *Dédicace*

*Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce travail à ceux qui, quels que soient les termes employés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.*

*À mes très chers parents Youcef et Fadhéla qui n'ont jamais cessé de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.*

*À mes frères Adlane et Abdelmalek qui m'ont toujours soutenue et encouragée.*

*À mes chers binômes Gueddoum Malika et Benmerad Mohamed Amine pour leur sérieux et leur sympathie.*

*À toute ma famille pour son soutien et son amour qui m'ont aidée à supporter les moments difficiles.*

*À tous mes amis et à la promo Microbiologie appliquée 2021/2022.*

*À la fin je dédie ce mémoire à tous ceux et toutes celles qui m'ont accompagnée et soutenue de près ou de loin.*

*Lemya*

## *Dédicace*

*Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce travail à ceux qui, quels que soient les termes employés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.*

*À mes très chers parents Mouloud et Baya qui n'ont jamais cessé de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.*

*À mes frères Said et Mohamed Mokrane qui m'ont toujours soutenue et encouragée.*

*À mes chers binômes Ait Amrane Lemya et Benmerad Mohamed Amine pour leur sérieux et leur sympathie.*

*À toute ma famille pour son soutien et son amour qui m'ont aidée à supporter les moments difficiles.*

*À tous mes amis et à la promo Microbiologie appliquée 2021/2022.*

*À la fin, je dédie ce mémoire à tous ceux et toutes celles qui m'ont accompagnée et soutenue de près ou de loin.*

*Malika*

## *Dédicace*

*Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce travail à ceux qui, quels que soient les termes employés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.*

*À mes très chers parents Mohamed El Hadi et Djahida qui n'ont jamais cessé de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.*

*À mes frères Oussama, Abdelhafidh et Abdel ilah et à mes sœurs Kaouther, Fatima Zahrah EL-batoul qui m'ont toujours soutenu et encouragé.*

*À mes chères binômes Gueddoum Malika et Ait Amrane Lemya pour leur sérieux et leur sympathie.*

*À toute ma famille pour son soutien et son amour qui m'ont aidé à supporter les moments difficiles.*

*À tous mes amis et à la promo Microbiologie appliquée 2021/2022.*

*À la fin je dédie ce mémoire à tous ceux et toutes celles qui m'ont accompagné et soutenu de près ou de loin.*

*Mohamed Amine*

## *Table de matière*

**Résumé**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

<b><i>INTRODUCTION GENERALE</i></b> .....	1
<b><i>CHAPITRE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</i></b>	
<b>1.</b> La vie à haute température.....	3
1.1. Les thermophiles.....	3
1.2. Phylogénie des thermophiles.....	5
1.3. Adaptation aux conditions thermophiles.....	5
1.3.1. Protéines.....	6
1.3.2Lipides.....	6
1.3.3Acides nucléiques.....	6
<b>2.</b> Eaux thermales.....	7
2.1. Définition des eaux thermales.....	7
2.2. Classification des eaux thermales.....	8
2.2.1. La température.....	9
2.3.2. La minéralisation.....	9
2.3.3. La composition chimique.....	9
2.3.3.1. Les eaux sulfurées.....	10
2.3.3.2. Les eaux sulfatées.....	10
2.3.3.3Les eaux chlorurées sodiques.....	11
2.3.3.4Les eaux bicarbonates (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ).....	11
2.3.3.5Les eaux à minéralisation spéciale.....	11
2.3.3.6Les eaux radioactives.....	12
2.3. Microbiologie des eaux thermales.....	12
2.4. Les sources thermales en Algérie.....	12
<b>3.</b> Domaine d'application des thermophiles.....	14
3.1. Applications basées sur les cellules entières.....	14
3.1.1. Agents de minéralisation.....	14

3.1.2. Production d'hydrogène.....	15
3.1.3. Piles à combustible microbien.....	15
3.2 Applications basées sur les biomolécules.....	15
3.2.1. Thermoenzymes.....	15
3.3. Applications basés sur les agents antimicrobiens.....	16
3.3.1. La productions des antibiotiques.....	16

## CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. Présentation du site d'étude.....	19
1.2. Prélèvement de l'échantillon.....	20
2. Etude physicochimique des eaux.....	21
3. Analyse isotopique des eaux.....	21
4. Caractérisation physicochimique des eaux de sources de Hamam Righa.....	21
4.1. Mesure électro métrique du pH avec l'électrode de verre.....	21
4.2. Mesure de la conductivité électrique.....	21
4.3. Température.....	22
4.4 .Turbidité.....	22
4.4. Détermination du Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et Magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ).....	23
4.5. TH.....	24
4.6. Dosage de sodium(Na et de potassium ( $\text{K}^+$ ) par photométrie de la flamme...	24
4.7. Détermination des chlorure ( $\text{Cl}^-$ ).....	24
4.8. Détermination des Sulfates ( $\text{SO}_4^{2-}$ ).....	25
4.9. Détermination de l'alcalinité ( $\text{HCO}_3^-$ ).....	26
4.10. Dosage des nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) avec la méthode au salicylate de sodium.....	26
4.11. Détermination des nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ).....	27
4.12. Dosage de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ).....	27
4.13. Détermination des phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).....	28
4.14. Détermination de la matière organique (MO).....	28
4.15. Détermination de l'Aluminium ( $\text{Al}^{3+}$ ).....	29
4.16. Détermination du fer (Fe) méthode à l'orthophénanthroline.....	29
4.17. Dosage du manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ) Méthode à la Formaldoxime.....	30
5. Caractérisation microbiologique des eaux des sources de Hamam Righa.....	30

5.1. Purification et identification des souches isolées.....	30
5.1.2. Enrichissement.....	30
5.1.3. Isolement et purification.....	30
<b>6. Détermination des caractéristiques phénotypiques.....</b>	<b>30</b>
6.1. Caractéristiques morphologiques et culturelles.....	30
6.2. Caractéristiques microscopiques.....	30
6.2.1. Examen à l'état frais.....	30
6.2.2. Coloration de Gram.....	30
<b>7. Tests biochimiques.....</b>	<b>31</b>
7.1. Test de l'oxydase.....	31
7.2. Test de catalase.....	31
7.3. Plaques API 20 <sup>E</sup> .....	31
<b>8. Activité antimicrobienne vis-à-vis des souches de références.....</b>	<b>31</b>
Screening primaire : détermination du temps et de la température de production	31

### **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISSCUSSION**

<b>1. Isolement et purification des isolats.....</b>	<b>34</b>
<b>2. Détermination des caractères physicochimiques.....</b>	<b>34</b>
2.1. pH.....	34
2.2. Conductivité électrique.....	34
2.3. Température.....	35
2.4. Turbidité.....	36
2.5. Calcium (Ca <sup>+</sup> ).....	36
2.6. Magnésium (Mg <sup>2+</sup> ).....	37
2.7. Sodium (Na <sup>+</sup> ).....	38
2.8. Potassium (K <sup>+</sup> ).....	38
2.9. Chlore (Cl <sup>-</sup> ).....	39
2.10. Sulfate (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ).....	39
2.11. Bicarbonate (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ).....	40
2.12. Nitrate (NO <sup>3-</sup> ).....	41
2.14. Nitrite (NO <sup>2-</sup> ).....	41
2.15. L'ammonium (NH <sup>4+</sup> ).....	42



2.16. Phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).....	43
2.17. Matière organique (MO).....	43
2.18. Aluminium ( $\text{Al}^{3+}$ ).....	44
2.19. Fer (Fe total) .....	45
2.20 Manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ).....	45
<b>3. Détermination des caractéristiques phénotypiques.....</b>	<b>49</b>
3.1. Caractéristiques morphologiques et culturales.....	49
3.1.2. Caractères culturaux : aspect macroscopique.....	49
3.1.1Caractères morphologique : aspect microscopique.....	50
3.2.1. Test Oxydase et Catalase.....	51
3.2.2. Plaque API 20 <sup>E</sup> .....	51
<b>4. Activité antimicrobienne vis-à-vis des souches de références.....</b>	<b>52</b>
Screening primaire.....	52
 <b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	 <b>57</b>
 <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	 <b>60</b>
 <b>ANNEXES.....</b>	 <b>68</b>

## *Liste des Abréviations*

**pH** ⇒ Potentiel hydrogène.

**NTU** ⇒ Unité de Turbidité Néphélométrique.

**µs/cm** ⇒ Microsiemens par centimètre.

**Ca<sup>+</sup>** ⇒ Calcium.

**mg/L** ⇒ Milligramme par litre.

**Mg<sup>+2</sup>** ⇒ Magnésium.

**Na<sup>+</sup>** ⇒ Sodium.

**K<sup>+</sup>** ⇒ Potassium.

**Cl<sup>-</sup>** ⇒ Chlore.

**SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>** ⇒ Sulfate.

**HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>** ⇒ Bicarbonate

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** ⇒ Nitrate.

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** ⇒ Nitrite.

**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>** ⇒ L'ammonium.

**PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>** ⇒ Phosphate.

**MO** ⇒ Matière organique

**Al<sup>3+</sup>** ⇒ Aluminium

**Fe** ⇒ Fer

**Mn<sup>2+</sup>** ⇒ Manganèse

**BN** ⇒ Bouillon Nutritifs

**GN** ⇒ Géloses Nutritifs

**S.aureus** ⇒ Staphylococcus aureus

**E.coli** ⇒ Escherichia coli

**P.aeruginosa** ⇒ Pseudomonas aeruginosa

**E1C3** ⇒ Pseudomonas horyzihabitans

**E2C1** ⇒ Pasteurella pneumotropica

**E3C1** ⇒ Stentrophomonas maltophilia

**E1C1** ⇒ Ochrobotrum anthropi.

**ADH**⇒Arginine-dihydrolase.

**LDC**⇒lysine-décarboxylase.

**ODC**⇒Ornithine-décarboxylase.

**ONPG**⇒O-nitrophényl-bêta-D-galactopyranoside.

**V**⇒volume.

**ISO**⇒Organisation internationale de normalisation.

**Nm**⇒nanomètre.

**TAC**⇒Titre Alcalimétrique Complet.

**TA**⇒Titre Alcalimétrique.

**E.D.T.A**⇒ Acide éthylène diamine tétra-acétique.

**°C**⇒Degré Celsius.

## *Liste des figures*

<b>Figure 1:</b> Eruption d'un geyser dans le parc national de Yellowstone, Wyoming, USA.....	3
<b>Figure 2:</b> Exemples de classement des organismes selon la température optimale de croissance.....	4
<b>Figure 3:</b> Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative de séquences de gènes ribosomiques.....	5
<b>Figure 4:</b> Exemples de biotopes naturels chauds.....	8
<b>Figure 5:</b> Cartographie et caractérisation des ressources géothermiques de l'Algérie.....	13
<b>Figure 6:</b> Carte géographique de Hammam Righa – Ain Defla.....	19
<b>Figure 7:</b> Forage de Hammam Righa.....	20
<b>Figure 8:</b> Point de prélèvement.....	20
<b>Figure 9:</b> Multi paramètre type (HACH USA).....	22
<b>Figure 10:</b> Turbidimètre.....	23
<b>Figure 11:</b> Dosage du Calcium (Ca <sup>2+</sup> ) et Magnésium (Mg <sup>2+</sup> ).....	23
<b>Figure 12:</b> Dosage de sodium (Na <sup>+</sup> ) et de potassium (K <sup>+</sup> ).....	24
<b>Figure 13:</b> Dosage du chlorure (Cl <sup>-</sup> ).....	25
<b>Figure 14:</b> Dosage de Sulfate (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ).....	25
<b>Figure 15:</b> Dosage de l'alcalinité (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ).....	26
<b>Figure 16:</b> Dosage des nitrates (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ).....	26
<b>Figure 17:</b> Dosage de nitrite (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....	27
<b>Figure 18:</b> Dosage de l'ammonium (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ).....	27
<b>Figure 19:</b> Dosage de phosphate ( PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ).....	28
<b>Figure 20:</b> Détermination de la matière organique (MO).....	29
<b>Figure 21:</b> Dosage du fer.....	29
<b>Figure 22:</b> Variation de pH de l'eau thermale en fonction du temps (jours).....	34
<b>Figure 23:</b> Variation de conductivité de l'eau thermale en fonction du temps....	35
<b>Figure 24:</b> Variation de la température de l'eau thermale en fonction du temps selon 2 mesures.....	35
<b>Figure 25:</b> Variation de turbidité de l'eau thermale de Hamam Righa en fonction du temps.....	36

<b>Figure 26:</b> Variation de Calcium( $\text{Ca}^+$ ) de l'eau thermale de Hamam Righa en fonction du temps.....	37
<b>Figure 27:</b> Variation du Magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) de l'eau thermale de Hamam Righa en fonction du temps.....	37
<b>Figure 28:</b> Variation du Sodium ( $\text{Na}^+$ ) de l'eau thermale de Hamam Righa en fonction du temps.....	38
<b>Figure 29:</b> Variation du Potassium( $\text{K}^+$ ) de l'eau thermale de Hamam Righa en fonction du temps.....	38
<b>Figure 30:</b> Variation du Chlore ( $\text{Cl}^-$ ) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.....	39
<b>Figure 31:</b> Variation du Sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) de Hamam Righa en fonction du temps.....	40
<b>Figure 32:</b> Variation du Bicarbonate( $\text{HCO}_3^-$ ) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.....	40
<b>Figure 33:</b> Variation du Nitrate( $\text{NO}_3^-$ ) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.....	41
<b>Figure 34:</b> Variation de Nitrite( $\text{NO}_2^-$ ) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.....	42
<b>Figure 35:</b> Variation de l'Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.....	42
<b>Figure 36:</b> Variation du Phosphate( $\text{PO}_4^{3-}$ ) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.....	43
<b>Figure 37:</b> Variation de la matière organique de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.....	44
<b>Figure 38:</b> Variation de l'Aluminium ( $\text{Al}^{3+}$ ) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.....	44
<b>Figure 39:</b> Variation du Fer (Fe total) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.....	45
<b>Figure 40:</b> Variation de Manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.....	45
<b>Figure 41:</b> L'aspect macroscopique de chaque isolat .....	49
<b>Figure 42:</b> L'aspect microscopique de chaque isolat x40.....	50

## *Liste des Tableaux*

<b>Tableau 1:</b> Les éléments les plus fréquemment retrouvés dans une eau Thermo-minérale.....	9
<b>Tableau 2:</b> Les différents types d'eaux minérales suivant la température.....	9
<b>Tableau 3:</b> La grande famille des eaux thermales.....	10
<b>Tableau 4:</b> Données physico-chimiques de quelques sources thermales du Nord de l'Algérie.....	13
<b>Tableau 5:</b> Caractéristiques culturales des isolats thermophiles étudiés.....	50
<b>Tableau 6:</b> Les résultats des souches pour le test d'oxydase et catalase.....	51
<b>Tableau 7:</b> Le biotype de chaque isolat.....	51
<b>Tableau 8 :</b> Résultats de l'activité antimicrobienne des isolats vis-à-vis des souches de références.....	53
<b>Tableau 9:</b> Résultat du screening primaire (diamètre de cylindre 5 mm obtenus à 55°C après 48 heures d'incubation.....	54

### **Résumé :**

L'Algérie dispose de réserves d'eau thermale considérables, qui devraient croître à l'avenir. Au fur et à mesure que l'on se rapproche du nord-est algérien, le nombre augmente. Ces écosystèmes offrent une opportunité unique aux chercheurs de rechercher de nouvelles souches thermophiles. Ces derniers produisent des biomolécules telles que les enzymes et les antibiotiques.

Les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles qui se trouvent dans les sources chaudes terrestres, ont des caractéristiques uniques, elles ont une adaptation moléculaire intrigante et constituent ainsi une précieuse source d'informations. Les hydrolases de ces organismes offrent des avantages pour améliorer ou créer nouveaux procédés biotechnologiques.

Le but de cette étude est de mettre en évidence des micro-organismes thermophiles dans la source de Hammam Righa à Ain Defla et tester les capacités antibactériennes de ces isolats vis-à-vis des souches de références. Les résultats montrent que les isolats thermophiles (*Pseudomonas horyzihabitans*, *Pasteurella pneumotropica*, *Stenotrophomonas Maltophilia*) possèdent un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de toutes ces bactéries (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) sauf un seul isolat qui n'a aucune activité microbienne (*Ochrobactrum anthropi*).

**Mots clés :** Hamam Righa, source hydrothermale, environnement extrêmophile, bactéries thermophiles, activités anti-microbiennes.

**Abstract:**

Algeria has considerable thermal water reserves, which are expected to grow in the future. As one approaches northeastern Algeria, the number increases. These ecosystems provide a unique opportunity for researchers to search for new thermophilic strains. The latter produce biomolecules such as enzymes and antibiotics.

The thermophilic and hyperthermophilic microorganisms found in terrestrial hot springs have unique characteristics; they have intriguing molecular adaptations and constitute a valuable source of information. The hydrolases of these organisms offer advantages for improving or creating new biotechnological processes.

The aim of this study was to highlight thermophilic microorganisms in the source of Hammam Righa in Ain Defla and to test the antibacterial capacities of these is isolates against reference strains. The results show that thermophilic isolates (*Pseudomonas horyzihabitans*, *Pasteurella pneumotropica*, *Stenotrophomonas Maltophilia*) have an inhibitory power against bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) except a single isolate which has not microbial activity (*Ochrobatrurn anthropi*).

**Key words:** Hamam Righa, hot spring, extremophilic environment, thermophilic bacteria, antimicrobial activities.



## ملخص

تمتلك الجزائر احتياطات كبيرة من المياه الحرارية والتي من المتوقع أن تنمو في المستقبل مع اقتراب المرء من شمال شرق الجزائر ، يزداد العدد. توفر هذه النظم البيئية فرصة فريدة للباحثين للبحث عن سلالات جديدة محبة للحرارة هذا الأخير ينتج الجزئيئات الحيوية مثل الإنزيمات والمضادات الحيوية.

تتميز الكائنات الحية الدقيقة المحبة للحرارة والمُحبة للحرارة الموجودة في الينابيع الساخنة الأرضية بخصائص فريدة ، فهي تتميز بتكيفات جزيئية مثيرة للاهتمام وتشكل مصدرًا قيمًا للمعلومات. توفر لهذه الكائنات مزايا ولتحسين أو إنشاء عمليات التكنولوجيا الحيوية الجديدة.

الهدف من هذه الدراسة هو تسليط الضوء على الكائنات الحية الدقيقة المحبة للحرارة في مصدر حمام الرقة في عين الدفلة واختبار القدرات المضادة للبكتيريا لهذه العزلات المعزولة ضد السلالات المرجعية. أظهرت النتائج أن العزلات المحبة للحرارة (*Pseudomonas horyzihabitans*, *Pasteurella pneumotropica*, (*Stenotrophomonas Maltophilia*) لها قوة مثبتة ضد جميع بكتيريا (*Staphylococcus aureus* ) (*ATCC25923*, *Escherichia coli ATCC 25922*, *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853*) باستثناء عزلة واحدة ليس لها نشاط جرثومي (*Ochrobatrium anthropi*).

**الكلمات الدالة:** حمام ريغة ، ينابيع ساخنة ، بيئة محبة للظروف القاسية ، بكتيريا محبة للحرارة ، أنشطة مضادة للميكروبات.

# ***INTRODUCTION***

### Introduction :

Les richesses de l'Algérie en sources chaudes, eaux minérales et eaux minérales thermales et leurs efficacité a été depuis longtemps bien établie (**Mekebret, 2017**).

Jusqu'au XXe siècle, les gens croyaient que la vie ne pouvait être que un environnement dans lequel les conditions environnementales sont compatibles avec la vie humaine. Découverte finale Dans les années 1930, la vie pouvait exister dans des environnements extrêmes comme les sources chaudes, sources hydrothermales et marais salants cela en effet ouvre le monde de la science à un tout nouvel ensemble de microbes fascinants. Ces microbes qui se développent dans ces biomes extrêmes sont globalement qualifiés des extrémophiles qui non seulement tolèrent ces conditions extrêmes, mais aussi sont nécessaires à sa croissance et à son développement (**Pikuta et Hoover, 2007**).

Selon les conditions extrêmes auxquelles sont confrontés les extrémophiles, Ils peuvent être thermophiles, psychrophiles, alcalophiles, acidophiles, piézotrophes, halophiles ou résistant aux halogènes... (**Irwin et Baird, 2004**).

La recherche sur les extrémophiles fournit une nouvelle clé pour comprendre les extrémophiles processus vitaux dans des conditions extrêmes et sont révélés par des systèmes biologiques pour y faire face (**Antranikian, 2009**). Outre la taxonomie, leur capacité est de générer des molécules significatives sur le plan biotechnologique qui constituent des propriétés plus valorisées par les scientifiques (**Rasuk et al., 2016**).

Notre recherche s'est concentrée sur le Hamman Riga, une station balnéaire très populaire préférée des curistes pour ses qualités climatiques et ses espaces verts et boisés. Cette étude avait comme but de cribler les micro-organismes isolés de cette source.

Ce travail s'est fait en plusieurs parties, dans la partie de la bibliographie nous explorerons les différents écosystèmes extrême ; ça sera basé sur les environnements à haute température, en particulier celles des applications des microorganismes thermophiles biotechnologiques en Algérie. Concernant la deuxième partie c'est consacrée aux méthodes de travail, et aux matériels utilisés lors de nos études. La dernière partie est consacré à nos résultats qui seront comparés et discutés avec des travaux plus ancien. Cela sera cloturé avec une conclusion générale et des perspectives.

# **CHAPITRE 1**

## ***REVUE BIBLIOGRAPHIQUE***

**1. La vie à haute température :**

Généralement, la température sur Terre est de 15°C, mais il existe des endroits extrêmes où la température est beaucoup plus élevée ou plus basse, et plus l'organisme est complexe plus la résistance est faible. Les organismes les plus résistants sont les procaryotes (archées). Les organismes multicellulaires peuvent survivre jusqu'à 50°C, les eucaryotes jusqu'à 60°C, les procaryotes entre 70 et 110°C et jusqu'à 250°C. ( **Hervant, 2021 ;2022**).

**1.1. Les thermophiles :**

Les thermophiles (du grec thermê, chaleur et philein, aimer) sont des organismes qui ont besoin de températures élevées pour se développer. Plusieurs définitions ont été proposées pour définir le thermophile. La plus reconnue est la suggestion de Thomas Brock, le microbiologiste à l'origine de la découverte des microbes thermophiles. Selon cette définition, les thermophiles sont des organismes dont la température optimale de croissance est supérieure à 60°C.



**Figure 1 :** Eruption d'un geyser dans le parc national de Yellowstone, Wyoming, USA.

C'est dans ce parc que Thomas Brock a découvert les premiers micro-organismes thermophiles (**Geslinh et al., 2010**).

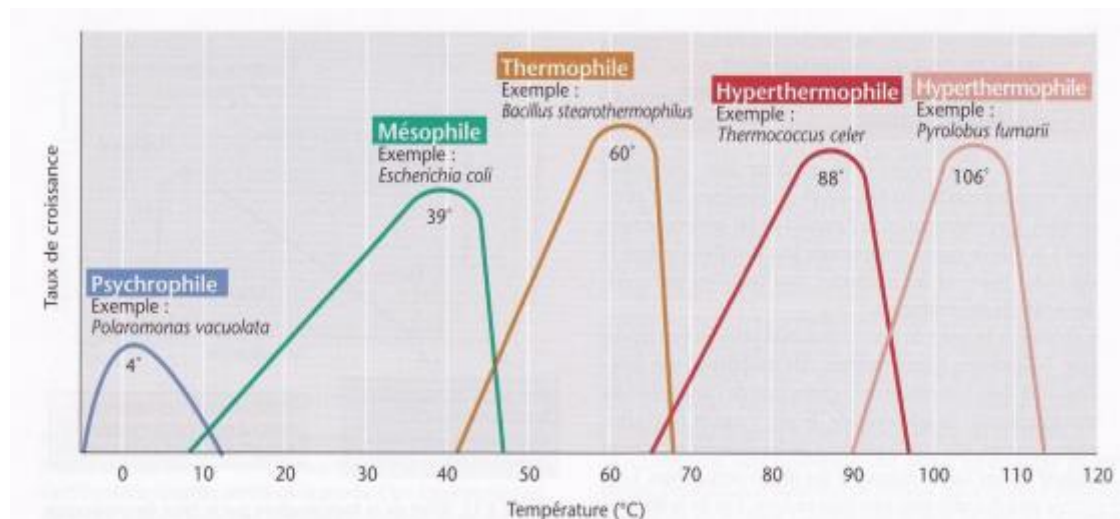
Une définition plus pratique et plus large a été proposée par Karl Stetter comme thermophiles, tous les organismes qui se développent à des températures supérieures à 45°C. La dernière définition est intéressante car elle définit 3 sous-catégories au sein des thermophiles :

\***Thermophiles modérés** qui se développent de manière optimale entre 55 et 65°C.

\***Thermophiles extrêmes** avec une température de croissance optimale entre 65 et 80°C.

\***Hyperthermophiles** dont la température optimale de croissance est supérieure à 80°C.

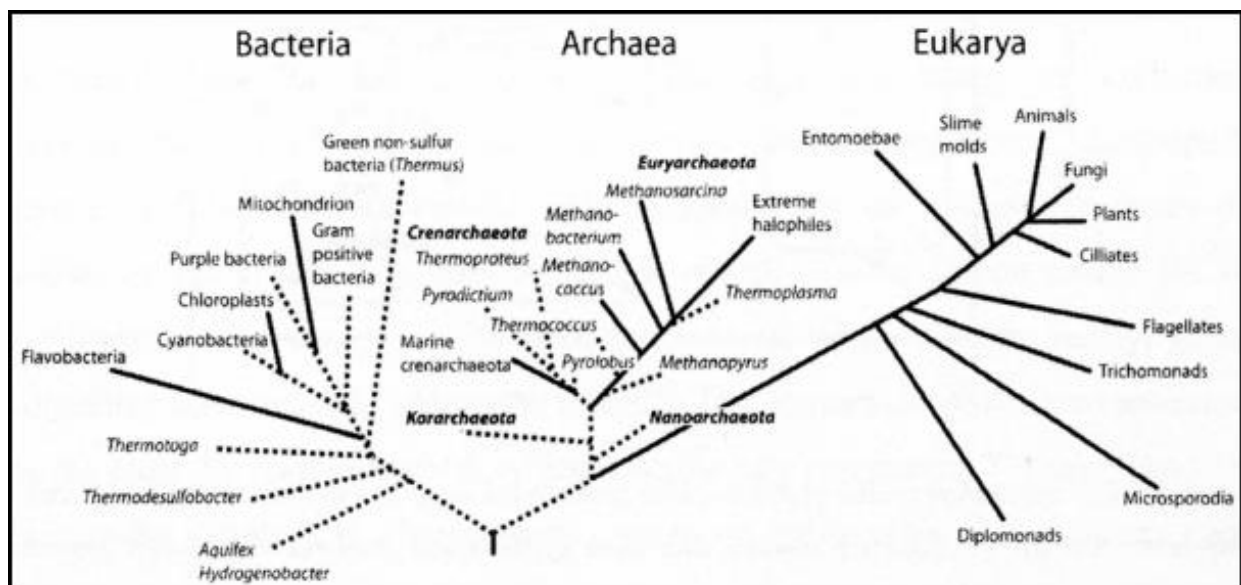
La grande majorité **des thermophiles** appartiennent aux 2 domaines des procaryotes : bactéries et des archées mais certains eucaryotes thermophiles sont également décrits. Chez les eucaryotes, les températures de croissance les plus élevées enregistrées à ce jour se situent autour de 50°C chez les plantes et les animaux, 60°C chez les algues unicellulaires, 60-62°C chez les champignons microscopiques et 70°C chez les protozoaires. Parmi les procaryotes, il existe un grand nombre d'hyperthermophiles dont beaucoup appartiennent aux archées. Le microorganisme le plus thermophile connu à ce jour est l'archaea *Pyrolobus fumarii* capable de se diviser à une température maximale de 113°C et est incapable de se développer en dessous de 90°C. La croissance des archées à des températures maximales de 121 et même 122°C a également été rapportée, mais ces résultats sont controversés. Cependant, il peut y avoir des micro-organismes capables de se développer à ces températures ou même à des températures nettement plus élevées. Au cours de l'événement BIG, les scientifiques tenteront d'isoler des microbes qui se développent à des températures supérieures à 113°C pour renverser notre compréhension des limites de la vie en termes de température. (Alain et al., 2009).



**Figure 2 :** Exemples de classement des organismes selon la température optimale de croissance (Madigan et Martinko, 2007).

**1.2. Phylogénie des thermophiles :**

Les microorganismes sont classés selon des caractères comme la morphologie et la physiologie, ce qui ne permet pas d'établir entre les groupes microbiens des relations d'évolution. L'introduction de la phylogénie basée sur l'analyse de séquences d'acides nucléiques en systématique microbienne a donné la possibilité d'établir une classification des microorganismes en termes d'évolution et une clarification des lignées phylogénétiques entre elles et les différents niveaux taxonomiques i.e. espèces, genres, familles etc. (Pace, 1997). De plus, l'origine des travaux de phylogénie moléculaire est d'une avancée scientifique majeure datant de la fin des années 1970 : la découverte par Carl Woese des Archaea, troisième domaine du vivant avec les Eukarya et Bacteria (Woese et al., 1990 ; Woese et Fox, 1977). On y trouve les microorganismes thermophiles dans les branches les plus profondes de l'arbre du vivant comme celui qui 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. (Postec, 2005).



**Figure 3 :** Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative de séquences de gènes ribosomiques. Les groupes phylogénétiques contenant des membres thermophiles ou exclusivement thermophiles sont indiqués en lignes pointillées (Postec, 2005).

**1.3. Adaptation aux conditions thermophiles :**

La vie à haute température est devenue possible par un certain nombre de mécanismes adaptatifs et/ou de molécules que l'on retrouve seulement chez les thermophiles. Les

différences structurales subtiles dans les protéines, les acides nucléiques et les lipides ont révélé l'analyse de biomolécules importantes chez les bactéries thermophiles. (**Alain et al., 2010**).

### **1.3.1. Protéines :**

Les protéines des thermophiles et hyperthermophiles sont plus thermostables que celles de leurs homologues mésophiles et fonctionnent de façon idéale à haute température. Cependant, il n'existe aucune règle générale permettant d'expliquer cette thermo stabilité, chaque protéine a sa propre stratégie de stabilisation. Cette thermo stabilité intrinsèque des protéines en général et des enzymes en particulier est le plus fréquemment due à des modifications mineures de la séquence en acides aminés contribuant le repliement de la protéine sous une forme compacte avec un certain nombre réduit de cavités internes, un nombre élevé de ponts ioniques favorisant à maintenir l'ensemble et à résister à la dénaturation. La synthèse en grandes quantités de solutés osmo-compatibles appuie également à défendre les protéines d'une délabrement thermique (**Santos et al., 2011**).

### **1.3.2. Lipides :**

Les membranes cytoplasmiques des microorganismes thermophiles ont une structure particulière qui permet d'avoir une stabilité et un fonctionnement faceaux températures élevées. Les bactéries hyperthermophiles ont une bicouche lipidique formée d'acides gras liés à un glycérol par une liaison ester et sont exceptionnellement riches en acides gras saturés. L'augmentation de la température est due à cette richesse en acide gras saturé, cela va permettre de maintenir une stabilité et une fluidité optimales dans des conditions de thermophilie (**Alain et al., 2010**).

### **1.3.3. Acides nucléiques :**

On pense que l'absence de la dénaturation d'ADN chez les procaryotes est à due à la présence d'une protéine présente chez les espèces hyperthermophiles. Tous les hyperthermophiles produisent une ADN topo isomérase appelée ADN gyrase reverse. Cette topo isomérase incite la formation de surenroulement positif de l'ADN, contrairement aux ADNgyrases présentes chez tous les procaryotes non thermophiles qui provoquent la formation d'un surenroulement négatif. Un mécanisme différent fait intervenir une augmentation des composés cellulaires solubles capables de stopper les lésions chimiques de l'ADN, tel que 2,3diphosphoglycérate de potassium cyclique présent en concentrations élevées chez *Methanopyrus*. En plus des sels



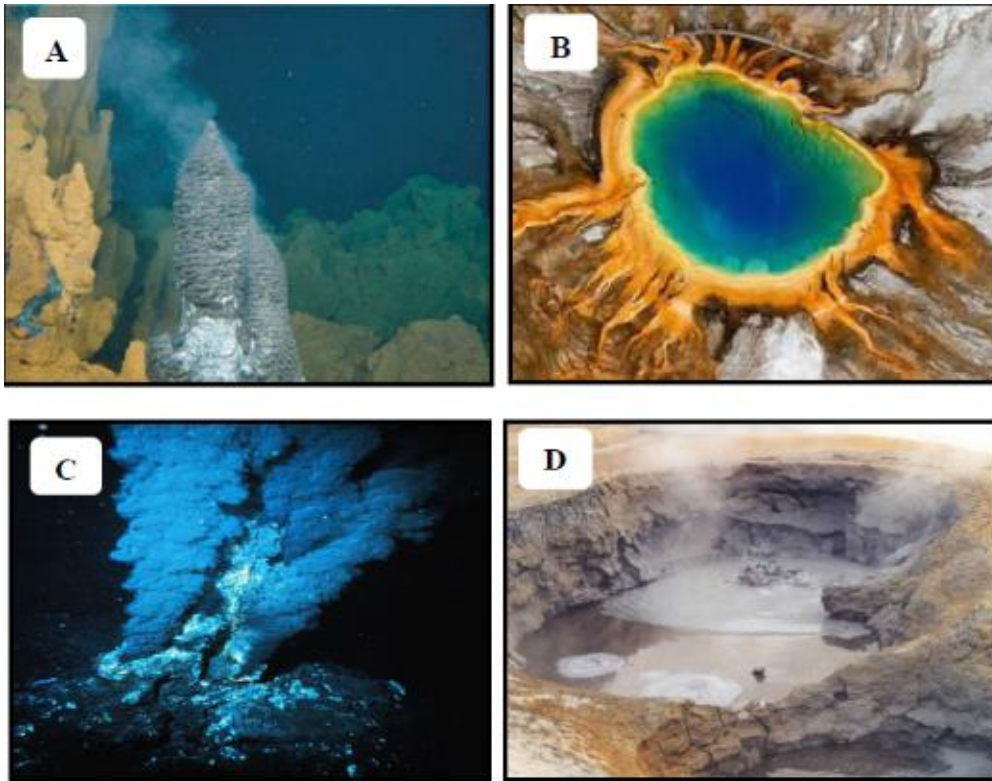
et de l'ADN gyrase reverse, d'autres protéines des hyperthermophiles peuvent interposer dans le maintien de l'intégrité de la double hélice d'ADN. Par exemple, une petite protéine thermostable appelée Sac7d, présente chez *Sulfolobus*, se fixe dans le petit sillon de l'ADN de façon non spécifique et augmente ainsi la température de dénaturation de l'ADN en augmentant largement la formation de boucles dans la molécule d'ADN. (**Madigan et Martinko, 2007**).

### 2. Eaux thermales :

#### 2.1. Définition des eaux thermales :

Une eau thermale est une eau de source naturellement minéralisée dont la composition permet une utilisation thérapeutique. Elle possède un ensemble de caractéristiques déterminant ses propriétés favorables à la santé, reconnues par l'Académie nationale de médecine.

Le thermalisme est l'ensemble des activités liées à l'exploitation et à l'utilisation des eaux thermales à des fins récréatives ou de santé. Cela se rapporte aussi bien à l'histoire, à l'économie, aux acteurs, au patrimoine qu'à l'ensemble des moyens (médicaux, sanitaires, sociaux, administratifs, etc.) mis en œuvre dans les stations thermales, géographiques. De ce fait, elles ont donc toutes des propriétés très différentes. Par exemple produit des eaux bicarbonatées, des eaux sulfurées sodiques, des eaux sulfatées et chlorées, des eaux oligométalliques chaudes. Comme tout écosystème, celui des eaux thermales doit être considéré comme un réseau fonctionnel d'interactions entre ses composantes. En cela, il constitue un système complexe, sujet d'étude de la systémique. Cette discipline s'attache à comprendre en quoi les propriétés d'un ensemble sont très différentes de la somme des propriétés de chacun des éléments qui la composent. Les propriétés des eaux thermales sont donc la résultante de ces interactions et elles ne peuvent se réduire à la simple lecture de leurs compositions minérales (**Sanders et Laure, 2006**).



**Figure 4** : Exemples de biotopes naturels chauds (**Bouacem, 2016**).

A. Cheminée hydrothermale d'anhydrite sur Rainbow, dorsale Médio-atlantique.

B. Octopus Spring, parc national de Yellowstone, Etats-Unis.

C. Fumeur noir dans l'océan Atlantique.

D. Geyser et Mare de Boue (Islande).

### **2.3. Classification des eaux thermales**

L'eau thermique est classée selon les critères suivants : température, minéralisation et composition chimique (**Anne, 2007**).

**Tableau 1 :** Les éléments les plus fréquemment retrouvés dans une eau Thermo-minérale.  
(DEA, D. D. E. A, 2006).

Critères :	Les Éléments
Gaz	Oxygène, azote, dioxyde de carbone et hydrogène sulfure
Sels minéraux	Chlorures, sulfates, calcium, magnésium, sodium, potassium...etc.
Oligo-éléments	Cuivre, zinc, arsenic, bore, brome, fer, manganèse, ...etc.

**2.3.1. La température**

L'eau minérale est classée selon sa température d'eau :

**Tableau 2 :** Les différents types d'eaux minérales suivant la température (DEA, D. D. E. A, 2006).

classe les eaux	froide	hypothermale	Thermale	Hyperthermale
température	< 20°C	20°C – 35°C	35°C – 50°C	> 50°C

**2.3.2. La minéralisation**

La teneur en sels minéraux des eaux thermales est très variable, ce qui leur confère des propriétés différentes. Ces minéraux peuvent être classés selon leur teneur, obtenue après déshydratation à 180°C (Schwenke, 2007).

**2.3.3. La composition chimique**

L'élément acide ou électronégatif joue bien une fonction active et sert de base à la création des divisions majeures, selon Jacquot et Willm (1984). Le carbone, le soufre et le chlore sont les éléments en question. Les bases qu'elles soient passives ou électropositives servent à définir les subdivisions. On distingue six principales classes d'eaux minérales :

**Tableau 3 : La grande famille des eaux thermales (DEA, D. D. E. A, 2006).**

• <b>SULFUREES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sulfurée sodiques</li> <li>• Sulfurée calcique (Aix-le-Bain)</li> </ul>
• <b>SULFATEES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sulfatées calciques (Contrex ; Hepar)</li> <li>• Sulfatées sodiques (Evax -le-Bain)</li> <li>• Sulfatées calciques et manganésiennes (Vittel)</li> </ul>
• <b>CHLORUREES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chlorurées sodiques fortes</li> <li>• Chlorurée sodiques faibles</li> </ul>
• <b>BICARBONATEES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bicarbonatées sodiques (Vichy ; Rano visy)</li> <li>• Bicarbonatée calciques (Volvic ; Evian)</li> <li>• Bicarbonatées mixtes (Carola)</li> </ul>
• <b>EAUX AMINERALSATION SPECIALE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Riche en cuivre</li> <li>• Riche en fer</li> <li>• Riche en Arsenic</li> </ul>
• <b>EAUX INDETERMINEES OU (OLIGO-MINERALE)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• On regroupe dans cette classe toutes les eaux très faiblement minéralisées</li> </ul>
• <b>EAUX RADIOACTIVES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aix-le-Therme (9,5 m<math>\mu</math>Ci/l) ; Allevard (0,8 m<math>\mu</math>Ci/l)</li> </ul>

### 2.3.3.1 Les eaux sulfurées :

Les eaux sulfurées constituent une catégorie d'eau ayant d'importantes propriétés dans le traitement des voies respiratoires.

- **les eaux sulfurées sodiques** (appelées "eaux Pyrénéennes") : Ces eaux sont faiblement minéralisées- chaudes- alcalines avec des teneurs en sulfures, riches en sodium, en silice et en fluorures ;la silice et le sodium dans le traitement des affections des voies respiratoires et aussi en dermatologie.

- **les eaux sulfurées calciques** : Ces eaux contiennent de fortes quantités de calcium combinées aux sulfures. La plupart de ces eaux sont froides. (Georges, 2010).

### 2.3.3.2. Les eaux sulfatées :

Ces eaux contiennent des sulfates ainsi que du calcium et du magnésium résultant de la dissolution du gypse dans les couches géologiques profondes. La solubilité du sulfate de calcium dépend de la température atteignant un maximum à 38°C. Dans cette catégorie, vous trouverez les eaux de Vittel, Contrexéville et Dax qui sont utilisées pour traiter les problèmes urinaires et les maladies métaboliques. (Georges, 2010).

**2.3.3.3. Les eaux chlorurées sodiques :**

Elles contiennent un ion dominant, les chlorures [Cl]<sup>-</sup> combinés au sodium. Ces eaux ne sont jamais embouteillées.

- les eaux chlorurées sodiques froides et très minéralisées : Ces eaux sont le résultat d'une dissolution naturelle dans un sous-sol de chlorure de sodium (halite), avec des teneurs pouvant atteindre la saturation (300 g/L). Elles sont extrêmement caustiques pour les installations métalliques et ne sont presque jamais utilisées dans des bains ou des douches propres parce qu'elles sont très corrosives.

- les eaux chlorurées sodiques chaudes et moyennement minéralisées

Leur minéralisation totale est généralement inférieure à quelques grammes par litre mais ces eaux sont corrosives aussi vis-à-vis des installations métalliques. **(Georges, 2010).**

**2.3.3.4. Les eaux bicarbonates ( $\text{HCO}_3^-$ ) :**

-**Les bicarbonates sodiques**, dont le sodium représente environ 80% de la masse cationique, aident au traitement des troubles gastro-intestinaux et hépatiques tout en ayant également un effet cicatrisant sur les mucus intestinaux et digestifs.

-**Les bicarbonates calcifiés**, dont le cation principal est le calcium, à des concentrations allant de 5 à 600 mg/l, ont des effets anti-inflammatoires apaisants et cicatrisants en dermatologie.

- **Les bicarbonatées mixtes** riches en dioxyde de carbone et en chlorures à des concentrations variables, d'où le nom de chloro-bicarbonatées mixtes ; Les bicarbonates mélangés à l'arsenic et à la radioactivité, siliceux et arsenicaux, ou calciques et magnésiennes sont tous utilisés dans le traitement du diabète, de l'obésité, de la constipation, des maladies cardiovasculaires et de l'hypertension artérielle.

-**Bicarbonatées ferrugineuses** contiennent une quantité d'ions Fe<sup>2+</sup>. Ce sont des eaux généralement froides, utilisées pour le traitement de l'anémie ; du paludisme et du rhumatisme **(DEA, D. D. E. A, 2006).**

**2.3.3.5. Les eaux à minéralisation spéciale :**

Elles sont riches en cuivre, en fer et en arsenic. Les eaux contenant du cuivre sont utilisées en dermatologie, les eaux contenant du fer sont utilisées dans certains traitements de l'anémie et les eaux contenant de l'arsenic sont utilisées dans les allergies. Ces eaux, en général, renforcent le système immunitaire **(DEA, D. D. E. A, 2006).**

**2.3.3.6. Les eaux radioactives :**

L'eau radioactive contient des produits chimiques radioactifs sous forme de thorium ou de sels de thorium émis. Ces eaux ont des propriétés sédatives, telles qu'antiprurigineuses, antalgiques, cicatrisantes et facilitant l'équilibre nerveux endocrinien. Les arthrites chroniques, l'obésité, l'hypertension artérielle et certains types d'hystérisme féminin sont tous traités avec ce médicament (DEA, D. D. E. A, 2006).

**2.4. Microbiologie des eaux thermales**

Les eaux thermales ne sont pas stériles mais contiennent une flore microbienne indigène d'un type lié aux caractéristiques physiques et chimiques de ces biotopes. Cette microflore peut être divisée en deux groupes sur une base métabolique :

\* **Les bactéries lithotrophes** : Ces bactéries jouant un rôle essentiel et important dans le cycle du soufre (*Clostridium bifermentans*, *Clostridium cauteretsensis*, *Thiobacillus*)

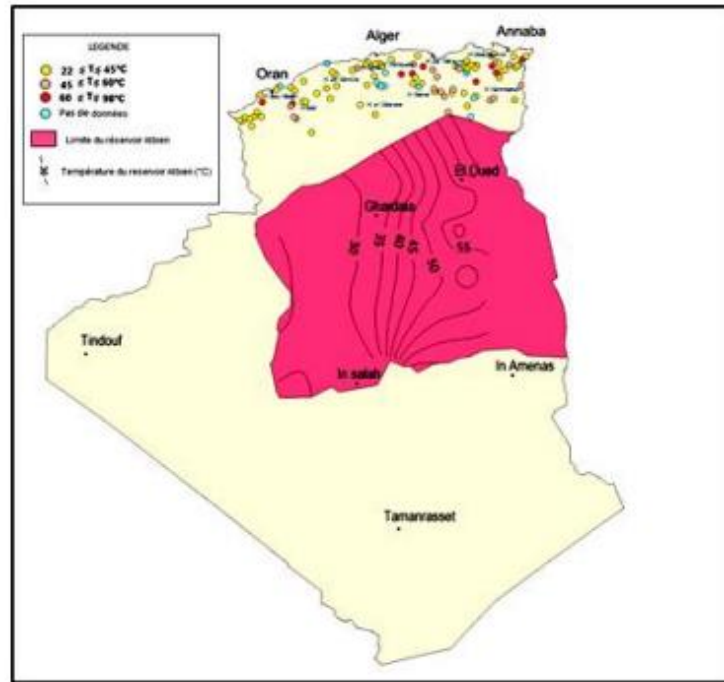
Et il a un rôle dans le cycle du fer (*Clostridium bifermentans*, *Clostridium cauteretsensis*, *Thiobacillus*, *Shewanella oneidensis*) ainsi que dans la production de plusieurs composés thermiques.

\* **Les bactéries organotrophes** : Cette bactérie est un bacille à Gram négatif (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas* .. ). Ces bactéries présentent des stabilités numériques dans le temps. Elles n'ont aucune importance pour la santé, mais toute augmentation soudaine de leur nombre peut indiquer une contamination de la ressource. Leur identification doit se faire régulièrement sur les lieux d'utilisation.

\*\*Ces eaux peuvent contenir une prolifération de pollution, qui pourrait résulter d'une défaillance de la source ou d'un manque d'entretien de l'installation en question. Parmi ces micro-organismes : *Staphylococcus aureus*, *Legionella*, *Clostridium sulfitoréducteurs* (Capdepuy et Canellas, 1995).

**2.5. Les sources thermales en Algérie**

Le Nord de l'Algérie abonde en sources thermales de composition chimique très variée. En effet, plus de 282 sources thermales ont été inventoriées par l'Agence Nationale des Ressources Hydrauliques (ANRH). Elles sont réparties sur 24 wilayas avec une plus forte concentration au Nord-est du pays. Ces sources thermales sont principalement exploitées en balnéothérapie (Ouali et al., 2019).



**Figure 5** : Cartographie et caractérisation des ressources géothermiques de l’Algérie  
(Ouali et al., 2018).

**Tableau 4** : Données physico-chimiques de quelques sources thermales du Nord de l’Algérie.  
(Toudert, 2008).

composition chimique	Source thermique en Algérie
1-sources alcalines	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ source Leblanc</li> <li>➤ Takitount</li> <li>➤ Ben Haroun</li> </ul>
2-sources bicarbonatées calciques :	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hammam Bou Hanifia</li> <li>➤ Ain NSour</li> <li>➤ Sdi M'cid</li> <li>➤ le Hammam</li> <li>➤ DjebelLekhal (Ain Tinn)</li> </ul>
3-sources sulfatées calciques :	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Oued Hammimine</li> <li>➤ Hammam Righa</li> <li>➤ Ouled Ghalia (Béni Hindel)</li> <li>➤ Hammam Mélouane</li> </ul>
4-sources chlorurées :	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Oued Hammimine</li> <li>➤ Hammam Righa</li> <li>➤ Ouled Ghalia (Béni Hindel),</li> <li>➤ Hammam Mélouane</li> </ul>
5- sources sulfurées	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hammam Zaid</li> <li>➤ Hammam Tassa</li> <li>➤ HammamEl Biban</li> <li>➤ Hammam Ben Chiguer</li> <li>➤ Hammam Béni Guecha</li> </ul>

### **3. Domaine d'application des thermophiles :**

Les thermophiles sont utilisés dans divers processus qui se produisent à des températures élevées et dans des domaines intéressants tels que la chimie, la pharmacie, l'alimentation et même la biologie moléculaire. Deux types d'applications différents peuvent être vues. La première repose sur l'utilisation directe des organismes et la seconde sur leurs biomolécules, ce sont des enzymes, mais aussi des protéines, des lipides, des perméats (produits de dégradation thermique) et divers métabolites secondaires. Les enzymes des micro-organismes isolés des sources chaudes ont un potentiel important en raison de leur thermo stabilité et de leur capacité à résister à la dénaturation sous stress dû à la barophilie ou à la tolérance de l'hôte. (Alain et al., 2010).

Les enzymes des thermophiles ont ou peuvent avoir des applications dans le blanchiment du papier, la conversion de l'amidon en dérivés de sucre, la dégradation de composés protéiques résistants, dans l'industrie textile ou dans les travaux de laboratoire d'ADN. Plusieurs enzymes produites par thermophilus sont commercialisées : diverses polymérases, ligases, protéases, phosphatase alcaline,  $\beta$ -mannanase, etc.

#### **3.1. 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 ces applications:

##### **3.1.1. Agents de minéralisation :**

Dans le traitement des minéraux industriels, lorsque les procédés chimiques conventionnels ne sont pas rentables, des micro-organismes oxydant le soufre et le fer sont utilisés pour libérer l'or incrusté dans les minéraux sulfurés et les concentrations de métaux. Parmi les archées réductrices de fer, *Pyrobaculum islandicum* et *Pyrobaculum furiosus* ont la capacité de convertir le chlorure d'or en or insoluble. Les micro-organismes thermophiles acidophiles tels que *Sulfolobus metalloïdes* et *Metallococcus* sont utilisés pour extraire le cuivre des minéraux sulfurés ou pour traiter certains minerais sulfurés tels que la pyrite. L'élimination et la réutilisation des pneumatiques usagés posent de sérieux problèmes, et le recyclage des matériaux en caoutchouc est souhaitable d'un point de vue économique et environnemental. Les espèces de *Pyrobaculum furiosus* sont capables de dé vulcaniser le caoutchouc, ce qui donne des produits dotés de bonnes propriétés mécaniques. (Bredberg et al., 2001).



### **3.1.2. Production d'hydrogène :**

La recherche sur la production de biohydrogène est attrayante pour les utilisations possibles du bio hydrogène comme source d'énergie propre. Les voies de production biologique d'hydrogène dépendent de l'apport de substrats organiques et sont bien adaptées à la production d'énergie et à l'élimination des déchets organiques (**Antranikian, 2008**). Les hydrogénases archéennes ont fait l'objet de recherches intensives. L'hydrogénase cytoplasmique de l'hyperthermophile *Thermococcus kodakaraensis* a la meilleure activité à 90°C et peut produire de l'hydrogène avec du méthyl viologène. Les mêmes enzymes membranaires ont été identifiées chez *Thermotoga tengcongensis* et d'autres membres de Thermotogales. (**Kádár et al., 2003**).

### **3.1.3. Piles à combustible microbien :**

Les thermophiles constituent un gisement très largement inexploité sur le terrain. Une étude a montré que les communautés microbiennes thermophiles isolées des sédiments marins étaient capables de générer du courant électrique dans une pile à combustible à 60°C en utilisant l'acétate comme combustible. (**Mathis et al., 2008**).

## **3.2 Applications basées sur les biomolécules :**

### **3.2.1. Thermoenzymes :**

Les enzymes thermostables des micro-organismes thermophiles « thermozymes » sont des biocatalyseurs dotés de propriétés uniques telles que la température, la stabilité chimique et la stabilité du pH. Ils peuvent être utilisés dans une variété de processus industriels où ils remplacent les enzymes mésophiles ou les produits chimiques. Les thermophiles et thermophiles appartenant à plusieurs genres : *Bacillus*, *Clostridium*, *Pyrococcus*, *Thermus*, *Thermus* et *Aquifex* ont été explorés pour les thermoenzymes. (**Sharma et al., 2019**).

Les enzymes thermiques sont généralement utilisées lorsque le procédé enzymatique est compatible avec les conditions de procédé existantes (haute température). Les principaux avantages de l'exécution du procédé à des températures plus élevées sont un risque réduit de contamination microbienne, une viscosité réduite, des taux de transfert améliorés et une meilleure solubilité du substrat (**Bruins et al., 2001**). Les thermoenzymes possèdent également des propriétés telles que la résistance aux solvants, la résistance aux dénaturants, la sélectivité du substrat et des vitesses de réaction plus élevées. Par conséquent, ils peuvent être

plus adaptés à l'application que les enzymes intermédiaires. Les mécanismes adaptatifs des thermoenzymes comprennent des changements dans la séquence et la composition des acides aminés, les modèles de liaison hydrogène, les interactions électrostatiques, les liaisons disulfure, les interactions hydrophobes et la capacité de liaison aux métaux, résultant en des structures conformationnelles supérieures. (Sharma et al., 2019).

### **3.3. Applications basés sur les agents antimicrobiens :**

#### **Les productions des antibiotiques :**

Les métabolites secondaires produits par les micro-organismes représentent une part importante Une source de composés à très grande diversité structurale. de nombreux métabolites Secondaire a un très haut potentiel d'activité biologique (Zerizer et al., 2006).

La qualité s'est considérablement améliorée depuis l'avènement des antibiotiques observé. Cependant, leur utilisation intensive conduit à une adaptation Des bactéries contre ces substances extraordinaires. En effet, ces dernières années Une augmentation inquiétante de la multi résistance des pathogènes, plus de 70% Les agents pathogènes sont résistants à la plupart des antibiotiques connus existants Marchés (Bérdy, 2012). Par conséquent, l'évolution des agents pathogènes résistants aux antibiotiques encourager la recherche de nouveaux agents antibactériens avec de nouvelles structures, et nouveaux modes d'action (Marinelli et Genilloud, 2014).

Les composés antimicrobiens naturels sont des métabolites secondaires : des micro-organismes tels que des bactéries thermophiles (Hayek et al., 2013 ; Tiwari et al ., 2009). Ces microbes sont en fait une source de nouvelles molécules comme répondre aux attentes socio-économiques (nouveaux médicaments, antibiotiques ou principaux atouts) (Anthony et al., 2014) Parmi cela :

*Agrobacterium* est un producteur potentiel d'antibiotiques. Certaines études prouvé le potentiel antibactérien de *Geobacillus*.

Garg et ses collègues rapportent la production de géobacilline I par différents Souches de *G. thermodenitrificans*(Garg et al., 2012).

*G. stearotherophilus* produit de la bactériocine (Pokusaeva et al., 2009).

Production de tobicine 218 et d'une substance inhibitrice de type bactériocine signalé par les souches *G. toebii* HBB-218 et HBB-247, respectivement Ozdemir et Biyiki (2012a ; 2012b).

*B. thermoleovorans* produit une bactériocine appelée *thermoléovorine*, il est maintenant classé comme *G. thermoleovorans* (Novotny et Perry, 1992).

*B. stearothermophilus* produit de la bactériocine thermophile maintenant classé comme *G. stearothermophilus* (Shafia, 1966).

Certaines archées et bactéries ont été décrites comme productrices de peptides agents antimicrobiens tels que la sulfadiazine produite par des espèces thermophiles et acidophiles *Archaeon Sulfolobus* (Ellen et al., 2011), et différents thermophiles Souches bactériennes thermophiles de *Streptococcus thermophilus* (Pranckute et al., 2015).

De nouvelles recherches prouvent la mise en place d'un système biologique synthèse verte de nanoparticules (NP) de **ZnO** à l'aide de micro-organismes. Les bactéries thermophiles ont été identifiées comme *Bacillus helideni*. Les NP synthétisées ont une large gamme d'applications biomédicales telles que leur utilisation comme véhicule de livraison, médicaments ciblés, thérapie génique, thérapie anticancéreuse, médicaments antibactériens, biocapteurs, imagerie par Résonance Magnétique (IRM) (Ali et al., 2014).

# **CHAPITRE 2**

## ***MATERIEL ET METHODES***

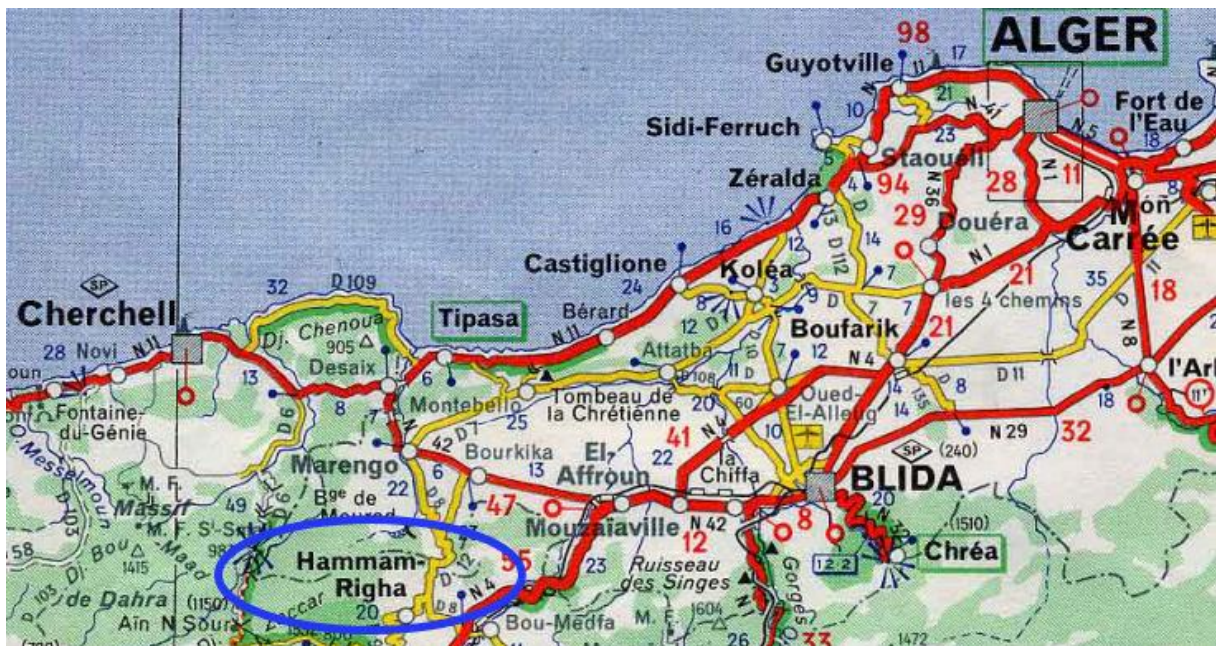
**1. Présentation du site d'étude :**

Le point de prélèvement choisi lors de cette étude était à Hammam Righa Wilaya Ain Defla; 100 km au Sud-ouest d'Alger, 640 m d'altitude. Les eaux thermses sont situées en montagne et sont soumis aux restrictions suivantes :

- \* Montes de Tiberranine au Nord;
- \*La ville d'Ain Bénien au Sud ;
- \* Monts du Zaccar à l'Ouest ;
- \*la ville de Boumedfaa à l'Est.

La région de Hammam Righa bénéficie d'un climat méditerranéen caractérisé par l'été hivers chauds, secs, doux et pluvieux. Précipitations, sous forme de pluie commençant principalement en octobre et se poursuivant jusqu'en mai, maximum en février. Précipitations annuelles en Hammam Righa légèrement supérieur à 700 mm. La température annuelle est de 18°C ; la température le plus basse a été enregistrée en Janvier (13°C), tandis qu'en Juillet, La température maximale est de 26°C. **(Boucareb et al., 2012).**

Cette station se recommande principalement pour les arthrites, les affections rhumatismales et goutteuses, les troubles nerveux, les blessures et les traumatismes. Elle convient aux hiverneurs (mais non aux phthisiques et tuberculeux), aux convalescents et à tous les malades qui ont besoin de suivre ou de continuer un traitement thermal.



**Figure 6:** Carte géographique de Hammam Righa – Ain Defla. (Google maps).

**1.2. Prélèvement de l'échantillon :**

Les échantillons d'eaux ont été prélevés en mois de Mars 2022 à partir de deux forages de la source thermique de Hammam Righa. Les prélèvements sont réalisés dans une zone stérile au niveau des réservoirs au-dessous de robinet a l'air libre dans des flacons stériles de 500 ml.



**Figure 7 : Forage de Hammam Righa (photo personnelle).**



**Figure 8 : Point de prélèvement (photo personnelle).**

### **2. Etude physicochimique des eaux :**

La température, le pH et la salinité ont des effets directs sur la croissance et le développement des communautés microbiennes dans des écosystèmes bien définis. La nature et la composition de l'eau déterminent le développement et la distribution de la flore microbienne indigène, c'est pourquoi il est jugé utile de déterminer les propriétés chimiques de l'eau étudiée. La conductivité, la turbidité et l'oxygène dissous ont été mesurés électrochimiquement. Le titre alcalin complet (TAC) a été déterminé par la méthode volumétrique EDTA. Le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium et divers oligo-éléments traversent Spectroscopie d'absorption atomique, et enfin dosage colorimétrique de l'arsenic (**Rodier et al., 2005**). Le nitrate, le nitrite, le chlorure, le phosphate, le bicarbonate, le sulfate et l'azote ammoniacal sont déterminé par chromatographie ionique (**Weiss, 2004**).

### **3. Analyse isotopique des eaux :**

L'activité spécifique des éléments radioactifs Potassium (K-40), Radium (Ra-226), Césium (Cs-137) dans l'eau a été déterminée par spectroscopie gamma (DéTECTEUR de type Ge-HP haute résolution). L'énergie déchargée permet l'identification de l'émetteur d'éléments radioactifs, il définit l'analyse qualitative de la méthode. L'analyse de la quantification est basée sur la mesure de l'intensité du rayonnement gamma, c'est-à-dire proportionnelle à l'activité spécifique de l'élément radioactif dans l'échantillon (**Tzortzisa et Certos, 2003**).

### **4. Caractérisation physicochimique des eaux de sources de Hamam Righa :**

#### **4.1. Mesure électro métrique du pH avec l'électrode de verre :**

Le pH a un rapport avec la concentration des ions hydrogène [H<sup>+</sup>] présent dans des solutions ou dans l'eau. La différence de potentiel existant entre une électrode de référence et une électrode de verre (Calomel - KCl saturé)... Plongeant dans une même solution, est une fonction linéaire du pH de celle-ci. Le potentiel de l'électrode est lié à l'activité des ions H<sup>+</sup> (**NF, T90-008**).

#### **4.2. Mesure de la conductivité électrique :**

La conductivité électrique d'une eau est la conductance d'une colonne d'eau comprise entre deux électrodes métalliques de 1 cm<sup>2</sup> de surface et séparées l'une de l'autre de 1 cm. L'unité de conductivité est le Siemens par mètre (S/m) (**NF, T90-031 ISO, N° 7888**).



**Figure 9** : Multi paramètre type (HACH USA) (photo personnelle).

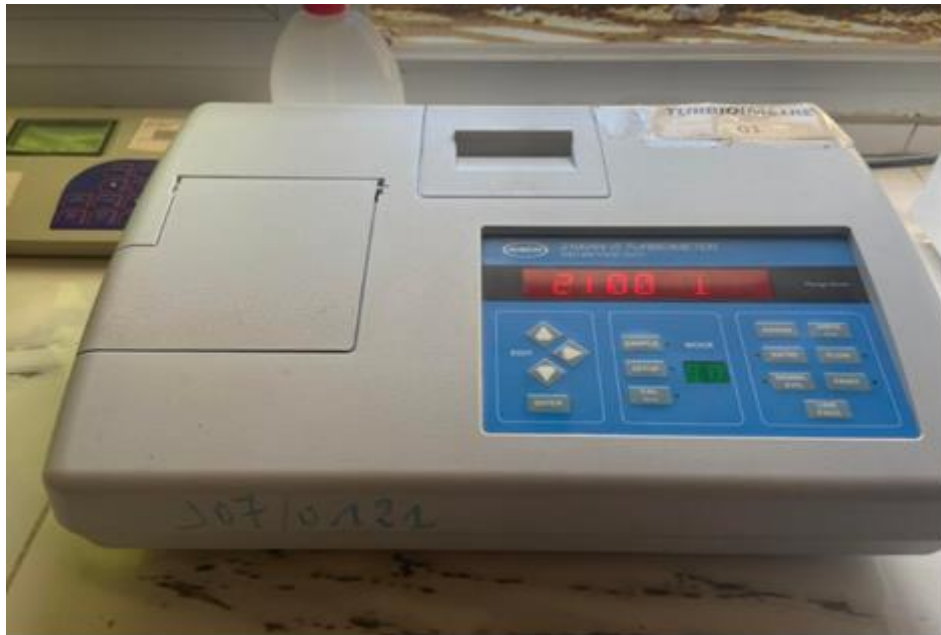
#### **4.3. Température :**

Il est essentiel de connaître la température de l'eau avec une bonne abstraction. En effet, celle-ci a un rôle dans la solubilité des sels et surtout des gaz, dans la dissolution des sels dissous (sur la conductivité), dans la précision du PH pour savoir l'origine de l'eau et des mélanges éventuels. **(Rodier, 1984)**

#### **4.4. Turbidité :**

C'est la réduction de la transparence d'un liquide due à la présence de matière non dissoute, ça a pour rôle de faire une comparaison de la lumière diffusée et la lumière transmise par l'échantillon d'eau et par une gamme étalon contenant de solutions de formazine **(NF, T 90 – 033 ISO, 7027)**.



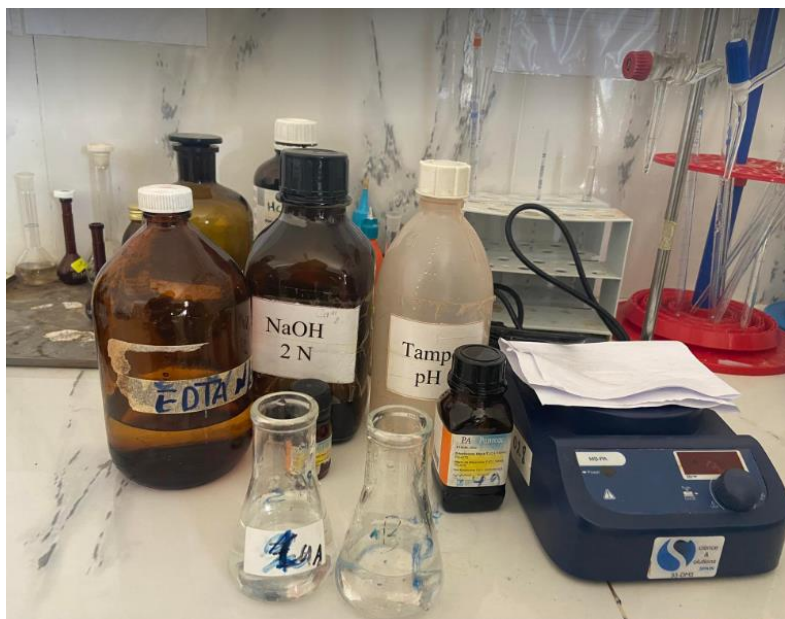


**Figure 10 : Turbidimètre (photo personnelle).**

**4.4. Détermination du Calcium ( $Ca^{2+}$ ) et Magnésium ( $Mg^{2+}$ ) :**

Le calcium est dosé avec une solution aqueuse d'E.D.T.A à pH entre 12 et 13.

Ce dosage se fait en présence du Murexide, l'E.D.T.A réagit tout d'abord avec les ions calcium libres puis avec les ions calcium combinés avec l'indicateur coloré qui vire alors de la couleur rouge au violet (ISO, N° 6058 OU NF, T90-003).



**Figure 11 : Dosage du Calcium ( $Ca^{2+}$ ) et Magnésium ( $Mg^{2+}$ ) (photo personnelle).**

**4.5. TH :**

La dureté de l'eau ou titre hydrotimétrique est une mesure globale de la concentration en sels dissous de l'eau en calcium et en magnésium. **(Rodier, 1984)**

En excès, les sels dissous de l'eau forment un composé insoluble avec le savon qui perd ainsi une partie de son pouvoir détersif et ne mousse plus que difficilement.

**4.6. Dosage de sodium( $\text{Na}^+$ ) et de potassium ( $\text{K}^+$ ) par photométrie de la flamme :**

La photométrie de la flamme est un des procédés les plus rapides et sensibles connus aujourd'hui pour le dosage des éléments alcalins et alcalino-terreux.

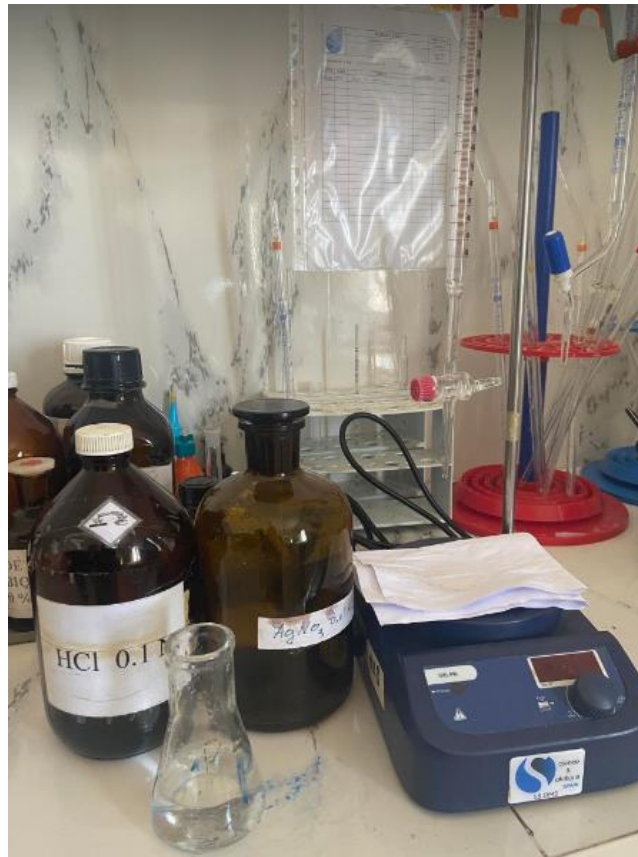
Les éléments à analyser (sodium, potassium lithium, calcium etc ...) sont généralement sous forme de sels. L'analyse se fait en partant de leurs solutions **(ISO, 9964/3)**.



**Figure 12 : Dosage de sodium ( $\text{Na}^+$ ) et de potassium ( $\text{K}^+$ ) (photo personnelle).**

**4.7. Détermination des chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) :**

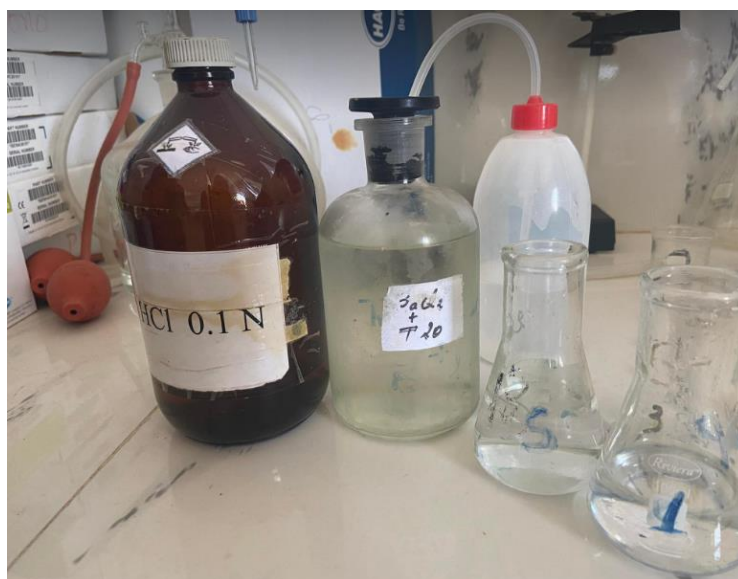
Réaction des ions chlorure avec des ions argent pour former du chlorure d'argent insoluble qui est précipité quantitativement. Addition d'un petit excès d'ions argent et formation du chromate d'argent brun-rouge avec des ions chromates qui ont été ajoutés comme indicateur. Cette réaction est utilisée pour l'indication du virage. Durant le titrage, le pH est maintenu entre 5 et 9.5 afin de permettre la précipitation **(NF, T 90 – 014)**.



**Figure 13 : Dosage du chlorure (Cl<sup>-</sup>) (photo personnelle).**

**4.8. Détermination des Sulfates (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>):**

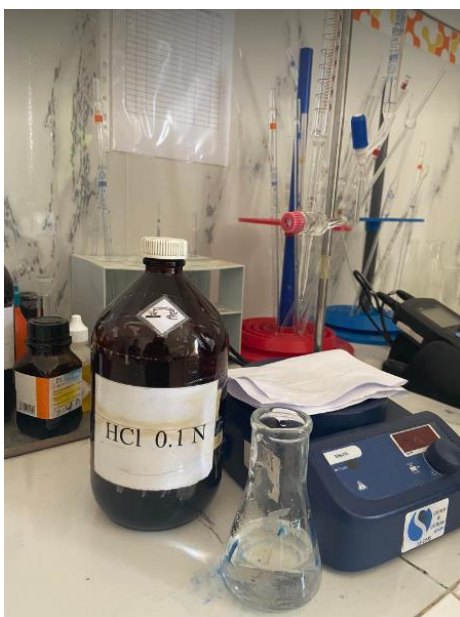
Les ions sulfates sont précipités et passés à l'état de sulfate de baryum en présence de Ba Cl<sub>2</sub> (Méthode Allemande élaborée par laboratoire).



**Figure 14 : Dosage de Sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) (photo personnelle).**

#### 4.9. Détermination de l'alcalinité ( $\text{HCO}_3^-$ ) :

L'alcalinité d'une eau correspond à la présence des bicarbonates, carbonates et hydroxydes. Détermination des volumes successifs d'acide fort en solution diluée nécessaire pour neutraliser, aux niveaux de  $\text{pH} = 8.3$  et  $4.3$ , le volume d'eau à analyser. La première détermination sert à calculer le titre alcalimétrique (TA), la seconde à calculer le titre alcalimétrique complet (TAC) (NF, T0-036).



**Figure 15 :** Dosage de l'alcalinité ( $\text{HCO}_3^-$ ) (photo personnelle).

#### 4.10. Dosage des nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) avec la méthode au salicylate de sodium :

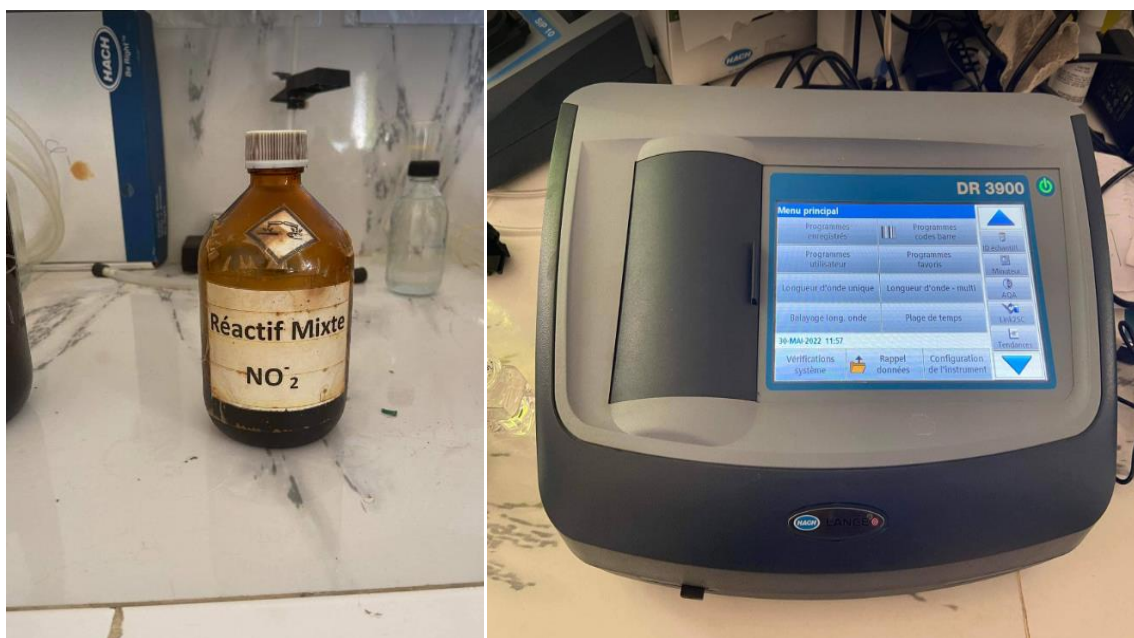
En présence de salicylate de sodium, les nitrates donnent du paranitrosylate de sodium coloré en jaune et susceptible d'un dosage colorimétrique (Rodier, 71).



**Figure 16:** Dosage des nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) (photo personnelle).

**4.11. Détermination des nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) :**

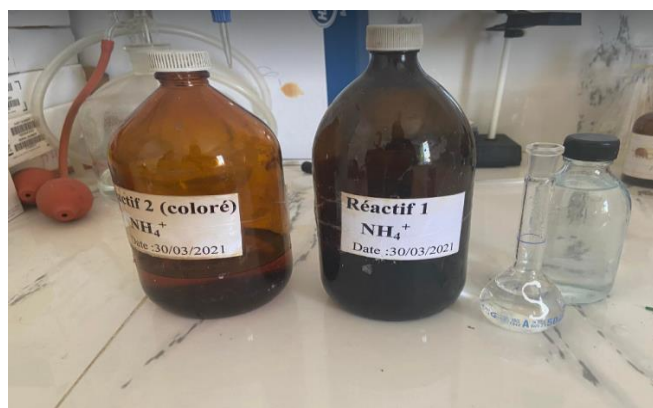
Les nitrites réagissent avec le Sulfanilamide pour former un composé diazoïque qui, après copulation avec le N1 Naphtyléthylène diamine dichlorure donne naissance à une coloration rose mesurée à 543nm (ISO, 5667).



**Figure 17: Dosage de nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) (photo personnelle).**

**4.12. Dosage de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) :**

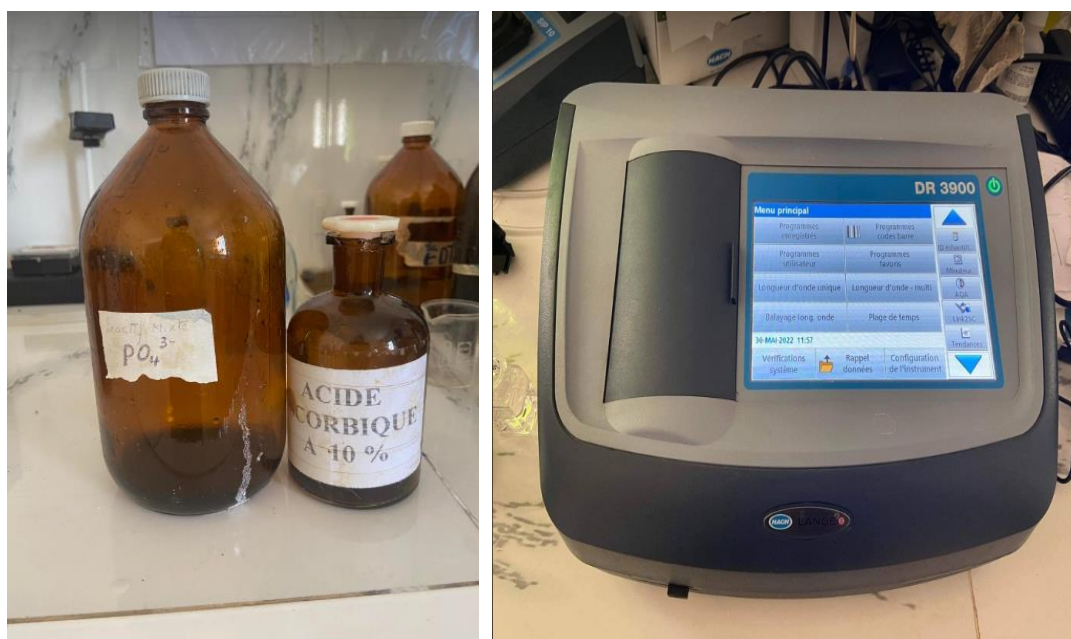
Conformément à la norme (ISO 7150), mesure spectrométrique à environ 655nm du composé bleu qui a été formé par réaction de l'ammonium avec les ions salicylate et hypochlorite avec la présence de nitro prussiate de sodium. (ISO, N°7150)



**Figure 18: Dosage de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (photo personnelle).**

#### 4.13. Détermination des phosphates ( $PO_4^{3-}$ ):

Formation en milieu acide d'un complexe avec le molybdate d'ammonium et le tartrate double d'antimoine et de potassium. Réduction par l'acide ascorbique en un complexe coloré en bleu qui présente deux valeurs maximales d'absorption l'une vers 700 nm, l'autre plus importante à 880 nm (ISO, N° 6878).



**Figure 19:** Dosage de phosphate ( $PO_4^{3-}$ ) (photo personnelle).

#### 4.14. Détermination de la matière organique (MO):

Attestation de conformité à la norme (ISO 8467 NA 2046), en présence de quantités connues de permanganate de potassium et d'acide sulfurique pendant une période de temps donnée (10 minutes). Les matières organiques de l'échantillon réduisent une partie du permanganate. Détermination de l'excès de permanganate par ajout d'une solution d'oxalate, suivi de Titrer l'excès d'oxalate avec du permanganate (FN, T90 -050).



Figure 20 : Détermination de la matière organique (MO) (photo personnelle).

#### 4.15. Détermination de l'Aluminium ( $Al^{3+}$ ) :

En présence d'Aluminium, l'ériocyanine vire au rouge violacé (Méthode allemande élaborée par laboratoire).

#### 4.16. Détermination du Fe (total) méthode à l'orthophénanthroline :

Addition d'une solution de phénanthroline 1.10 à une prise d'essai et mesurage photométrique du complexe rouge-orange à une longueur d'onde de 510nm.

Pour le dosage du fer total et du fer total dissous, du chlorhydrate d'hydroxylamine est ajouté pour réduire le  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  (ISO, 6332).

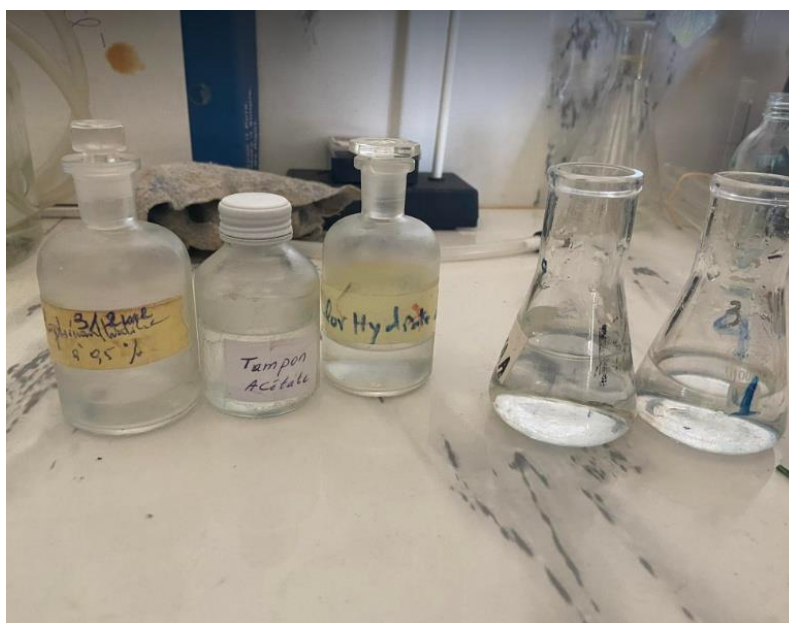


Figure 21: Dosage du Fe (photo personnelle).

### 4.17. Dosage du manganèse ( $Mn^{2+}$ ) Méthode à la Formaldoxime :

Addition d'une solution de Formaldoxime à une prise d'essai et mesurage spectrométrique du complexe rouge orangé obtenu à une longueur d'onde d'environ 450 nm.

Si le manganèse en suspension ou lié organiquement est présent, un traitement préalable est nécessaire pour mettre le manganèse sous forme susceptible de réagir à la Formaldoxime (ISO, 6333).

### 5. Caractérisation microbiologique des eaux des sources de Hamam Righa :

#### 5.1. Purification et identification des souches isolées :

##### 5.1.2. Enrichissement :

02ml de différents échantillons d'eau ont été mis dans 18ml du bouillon nutritif, celui-ci va servir pour l'isolement des souches puis ensuite être incubé à 55°C entre 6 et 9 jours jusqu'à l'apparition d'un trouble.

##### 5.1.3. Isolement et purification :

01ml du bouillon est ensemencé en profondeur de la gélose nutritive (GN). Les boîtes vont être incubées à 55°C sous atmosphère humide pendant 24 à 48h. Les colonies ainsi obtenues vont être purifiées par passage successifs entre le BN et la GN (Khelil et al., 2013).

### 6. Détermination des caractéristiques phénotypiques :

#### 6.1. Caractéristiques morphologiques et culturales :

Déterminer l'aspect macroscopique des colonies (forme, pigmentation, taille, etc.) après 24 heures en atmosphère à 55°C, après croissance sur milieu solide humide.

#### 6.2. Caractéristiques microscopiques :

Morphologie, arrangement cellulaire et gram des isolats sont précisés à travers les cultures jeunes par technique de coloration (incuber à 55°C pendant 24 heures) différenciation décrite par Gram (1884) à l'aide d'un microscope optique (ZEISS – Allemagne).

##### 6.2.1. Examen à l'état frais :

Il permet la détermination de la morphologie des bactéries vivantes, de leur mode de regroupement et de leur mobilité. (Girard et Rougieux, 1967).

##### 6.2.2. Coloration de Gram :

La coloration de Gram permet de mettre en évidence les propriétés tinctoriales de la paroi bactérienne, largement utilisée en bactériologie médicale cela permet de colorer les bactéries et les distinguer par leur capacité à fixer le violet de gentiane (Gram +) ou le magenta (Gram-).



Par conséquent, selon la méthode de coloration de Gram, les bactéries peuvent être divisées en 2 groupes.

### 7. Tests biochimiques :

#### 7.1. Test de l'oxydase :

Test d'oxydase est basé sur une éventuelle production bactérienne Oxydase intracellulaire dans l'oxygène atmosphérique et Cytochrome C (Vezina et Lacroix, 2000). Pour déterminer l'activité de l'oxydase, placez les colonies d'échantillons Sur les réactifs d'oxydase. Le développement du violet signifie Tests positifs et isolat a oxydase (Kovacs et al., 1995).

#### 7.2. Test de catalase :

La catalase est une enzyme produite en grande quantité par des bactéries Un métabolisme respiratoire qui détruit le peroxyde d'hydrogène et libère de l'oxygène (Vezina et Lacroix, 2000). La technique consiste à prélever une partie de la colonie et à l'émulsifier dans Une goutte de peroxyde d'hydrogène (30 V). La libération des bulles signifie qu'il y a production de catalase (Prescott et al., 2003).

#### 7.3. Plaques API 20E :

C'est la recherche de la bêta-galactosidase (ONPG), l'Ornithine Décarboxylase (ODC), Lysine Décarboxylase (LDC) et Arginine Dihydrolase (ADH), Production d'H<sub>2</sub>S, utilisation de citrate, production d'indole et réaction de Voges-Proskauer, liquéfaction de la gélatine, hydrolyse de l'escine et dégradation des sucres réalisés. L'API contient 20 microtubules contenant des substrats déshydratés. L'ensemencement des micros tubes se fait avec une suspension bactérienne réalisée en milieu API. L'incubation est réalisée en milieu humide à une température de 55°C. (Coorevits et al., 2011). Les réponses générées par la latence entraînent des changements de couleur spontanée ou réactifs ajoutés.

### 8. Activité antimicrobienne vis-à-vis des souches de références :

#### Screening primaire : détermination du temps et de la température de production :

Un screening primaire est effectué afin de montrer la capacité des isolats thermophiles à produire des antimicrobiens. La méthode des cylindres d'agar permet de tester l'activité antibactérienne par la méthode ci-dessous :

Les isolats thermophiles sont ensemencés sur la gélose nutritive par écouvillon ; afin d'avoir un tapis ; à 55 et 60°C pendant 24 et 48 heures sous atmosphère humide. La normalisation de l'inoculum des bactéries test est une étape essentielle pour la reproductibilité des tests. L'inoculum est préparé de la même manière que celui de

l'antibiogramme exécuté par la méthode du CLSI (2010).

A l'aide de l'extrémité plate d'une pipette Pasteur stérile des cylindres d'agar d'environ 05mm de diamètre sont prélevés à partir de la gélose nutritive, où les isolats thermophiles sont ensemencés, ensuite, ces cylindres sont mise sur les boites de Pétri ayant une gélose Muller-Hinton préalablement ensemencée par les bactéries test.

Les boites sont par la suite laissées pendant 02 heures à 04°C (pour permettre la diffusion des activités antimicrobiennes) puis incubées à la température convenable pour chaque type des bactéries test pendant 24 heures. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés par la suite (**Aissaoui, 2019**).

# **CHAPITRE 3**

## ***RESULTATS ET DISCUSSIONS***

### 1. Isolement et purification des isolats :

Après l'incubation de 216 heures (9jours) à 55°C des tubes contenant du bouillon nutritif (BN), un trouble a été décelé. Les tubes qui présentaient un trouble ont été ensemencés sur une gélose nutritive (GN) en **profondeur**. Après 24h à 48h, plusieurs colonies qui présentent des aspects macroscopiques différents sont apparues. Après une série de purification, quatre isolats ont été choisis en se basant sur leur morphotype et ont été nommés selon un code composé de 2 lettres et 2 numéros : E1C1, E1C3, E2C1 et E3C1.

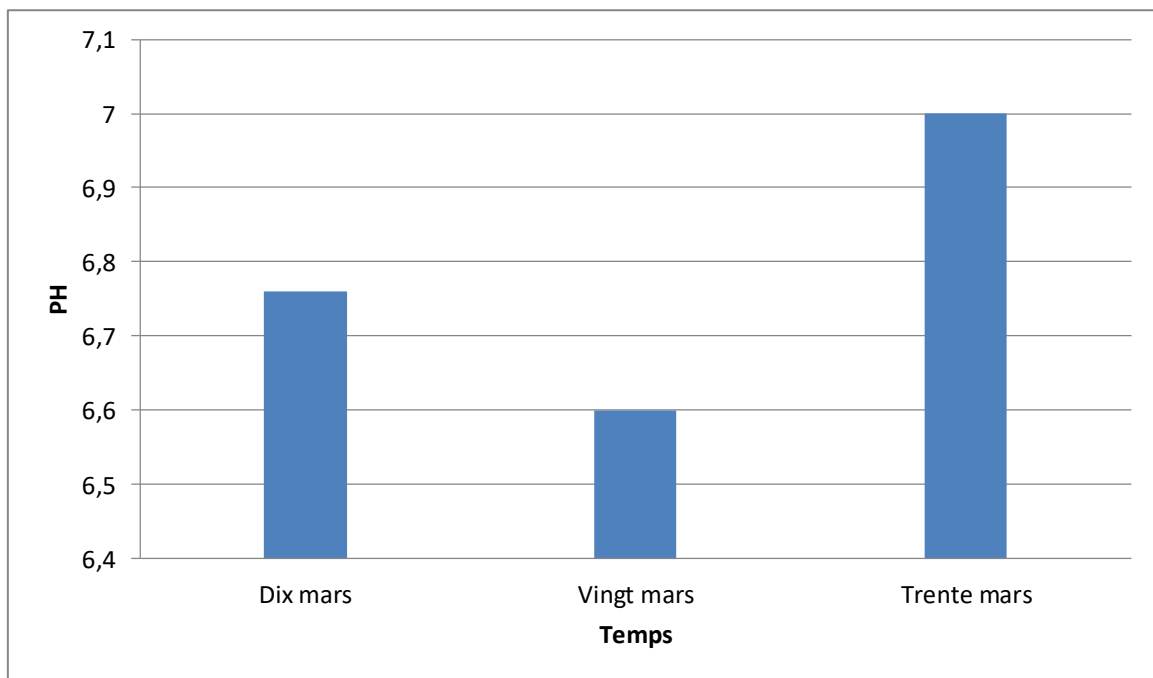
### 2. Détermination des caractères physicochimiques :

#### 2.1. pH :

Le 10/03/2022, le pH a été mesuré à 6,76 tandis que dix jours plus tard il était à 6,60 et le 30/03/2022 à 7 ce qui signifie que le pH de l'eau thermale de Hamam Righa est **neutre**.

**La moyenne du pH est de 6,78.**

Le résultat de la mesure du pH est représenté sur la figure suivante :



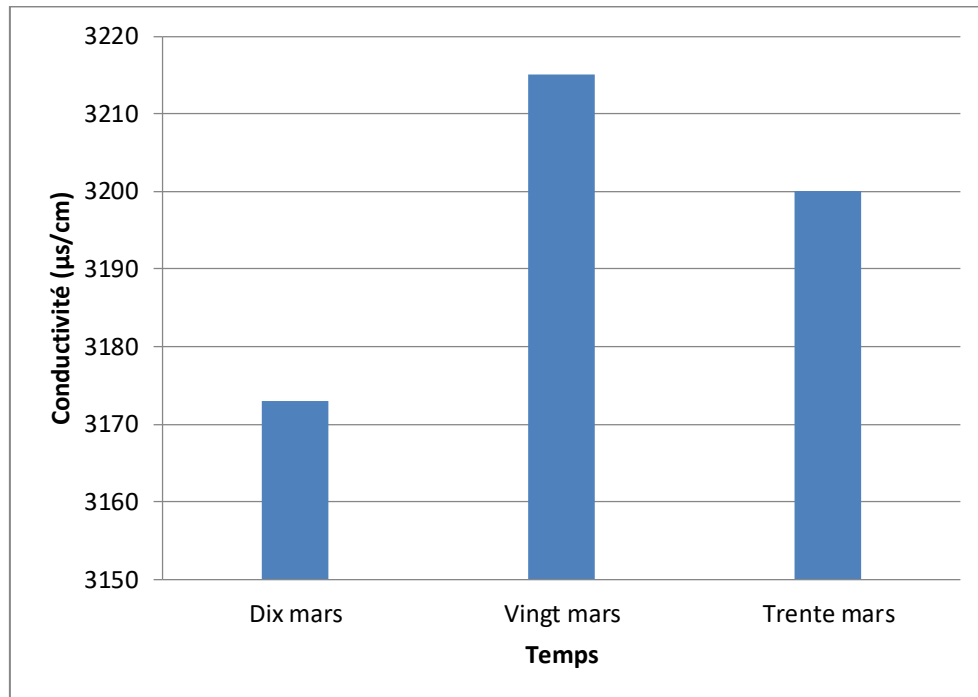
**Figure 22 :** Variation de pH de l'eau thermale en fonction du temps (jours).

#### 2.2. Conductivité électrique :

La conductivité s'est mesurée à 3173 $\mu$ s/cm lors du premier prélèvement le 10/03/2022. Dix jours plus tard, elle était à 3215 $\mu$ s/cm tandis que pour le troisième et dernier prélèvement, elle était à 3200 $\mu$ s/cm. On conclut que l'eau thermale a une valeur de **conductivité élevée**.

**La moyenne de la conductivité est de 3196 $\mu$ s/cm.**

Les résultats sont présentés dans la figure suivante :



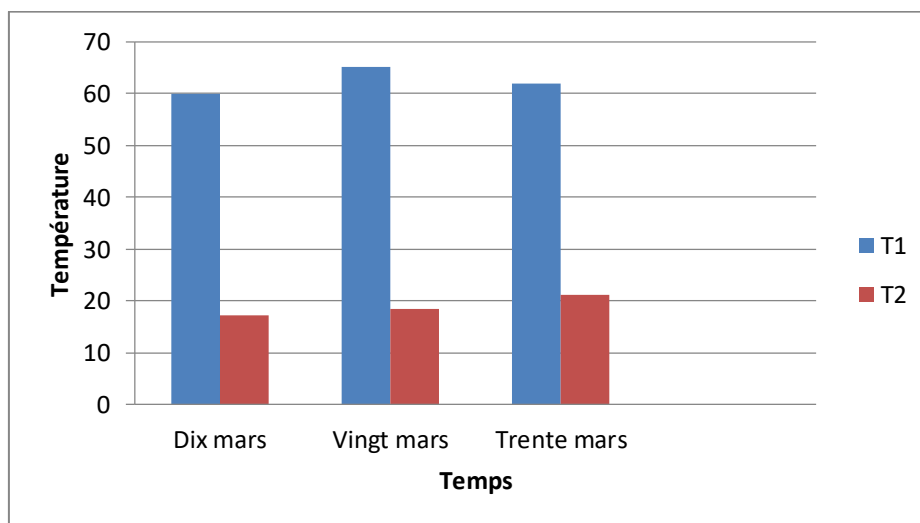
**Figure 23** : Variation de conductivité de l'eau thermique en fonction du temps.

### 2.3. Température :

La température a été mesurée 2 fois, la première fois lors des **prélèvements** et la seconde lors de l'**analyse**.

Les résultats de la température de l'eau thermique de Hamam Righa prise sur le terrain durant le mois de Mars, du 10 au 30 Mars 2022, ont **une moyenne de température 62,33°C**.

Ces résultats sont représentés sur la figure suivante :



*T1 : température de prélèvement      T2 : température d'analyse*

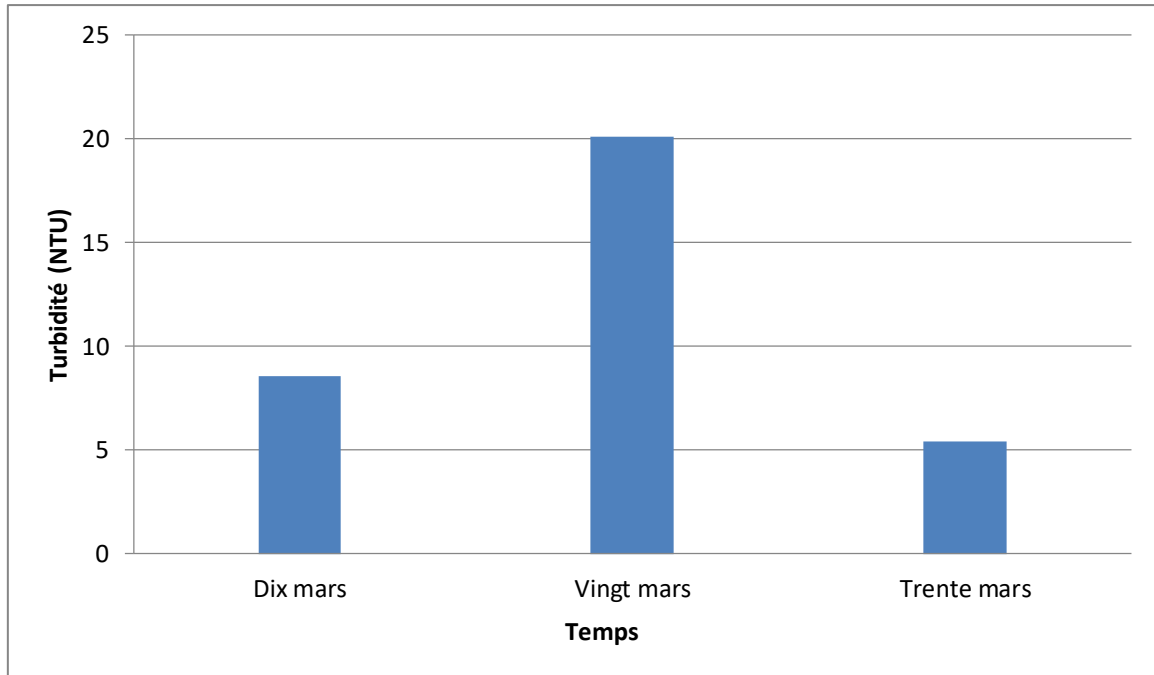
**Figure 24** : Variation de la température de l'eau thermique en fonction du temps selon 2 mesures.

**2.4. Turbidité :**

La turbidité a été mesurée à 8,52NTU le 10/03/2022, à 20,1NTU le 20/03/2022, et pour le dernier prélèvement effectué le 30/03/2022, elle était à 5,4NTU.

**La moyenne de la turbidité était de 11,34NTU.**

Les résultats sont précisés ci-dessous :



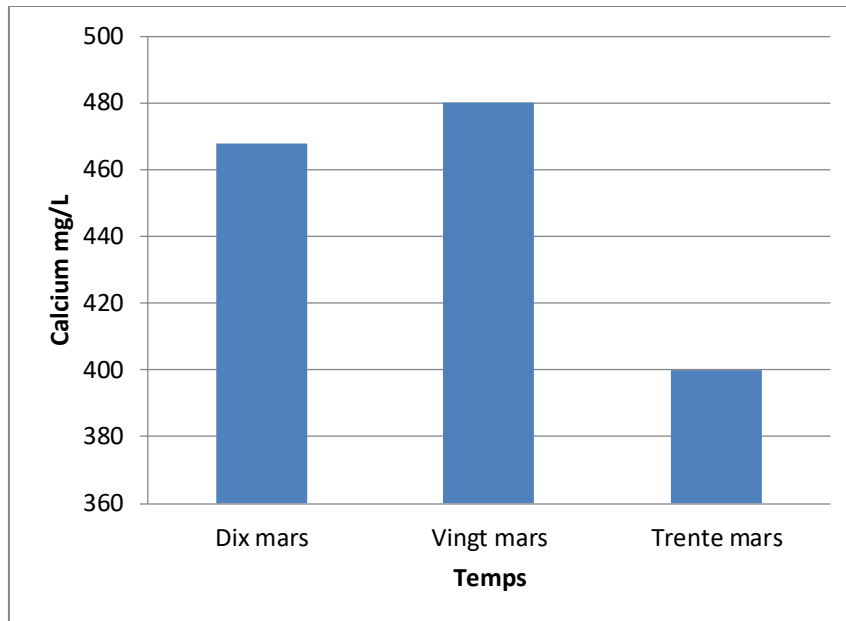
**Figure 25 :** Variation de turbidité de l'eau thermale de Hamam Righa en fonction du temps.

**2.5. Calcium (Ca<sup>+</sup>) :**

La mesure du Calcium (Ca<sup>+</sup>) lors du premier prélèvement était à 468mg/L, à 480mg/L lors du deuxième tandis que pour le dernier, elle était à 400mg/L.

**La moyenne du Calcium (Ca<sup>+</sup>) était de 449,33mg/L.**

Les résultats sont représentés sur la figure suivante :



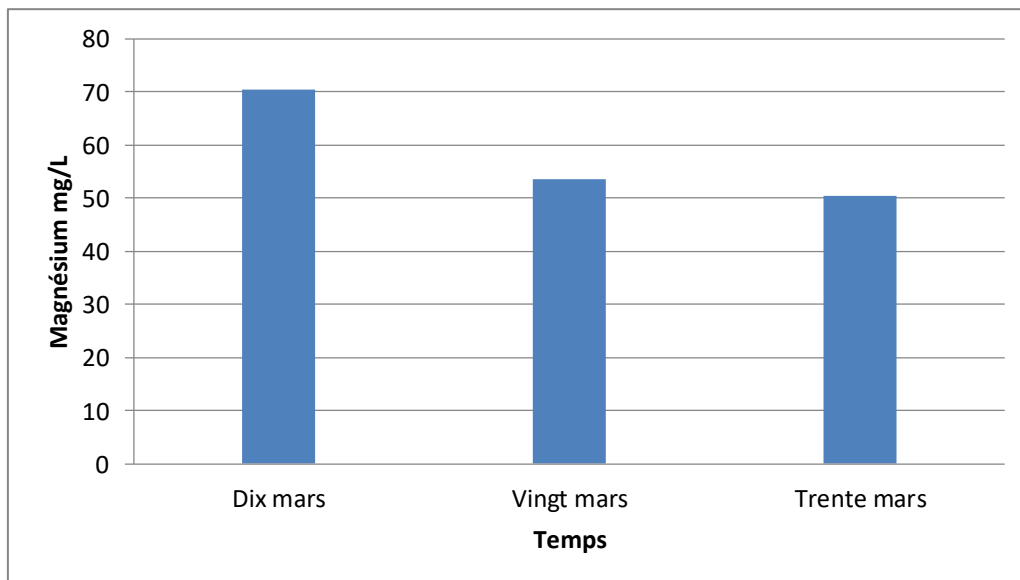
**Figure 26 :** Variation de Calcium ( $\text{Ca}^+$ ) de l'eau thermale de Hamam Righa en fonction du temps.

**2.6. Magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ )**

Le Magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) était à 70.47mg/L le 10/03/2022, à 53,46mg/L le 20/03/2022 et lors du dernier prélèvement fait le 30/03/2022, il était à 50.5mg/L.

**La moyenne du Magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) était de 58,14mg/L.**

Les résultats sont montrés dans la figure suivante :



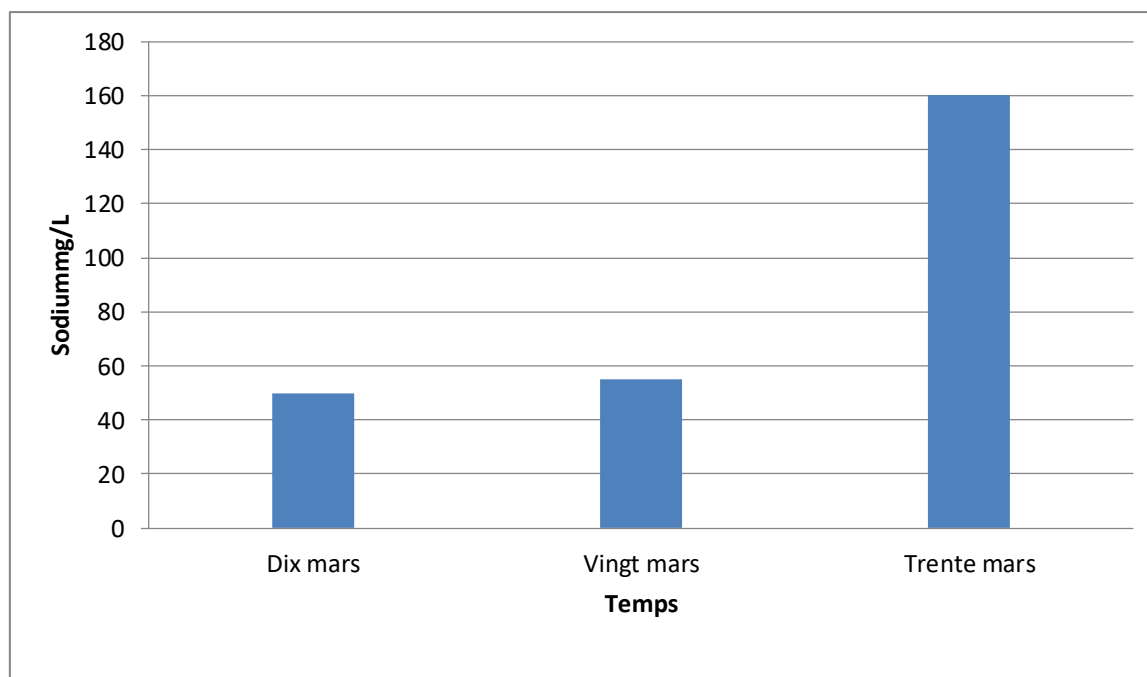
**Figure 27 :** Variation du Magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) de l'eau thermale de Hamam Righa en fonction du temps.

**2.7. Sodium ( $\text{Na}^+$ ) :**

Le sodium a été trouvé lors du premier prélèvement à 50mg/L, lors du deuxième il était à 55mg/L et au moment du dernier prélèvement il était à 160mg/L.

**La moyenne du Sodium ( $\text{Na}^+$ ) était de 88,3mg/L.**

Les résultats sont sur la figure suivante :



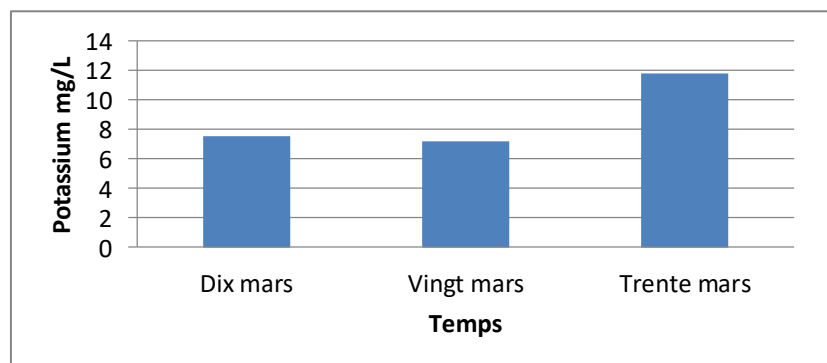
**Figure 28 :** Variation du Sodium ( $\text{Na}^+$ ) de l'eau thermique de Hamam Righa en fonction du temps.

**2.8. Potassium ( $\text{K}^+$ ) :**

Le potassium a été mesuré et trouvé à 7,5mg/L le 10/03/2022, à 7,2mg/L le 20/03/2022 et à 11,8mg/L au dernier prélèvement.

**La moyenne du Potassium ( $\text{K}^+$ ) était de 8,83mg/L.**

Les mesures retrouvées sont dans la figure suivante :



**Figure 29 :** Variation du Potassium ( $\text{K}^+$ ) de l'eau thermique de Hamam Righa en fonction du temps.

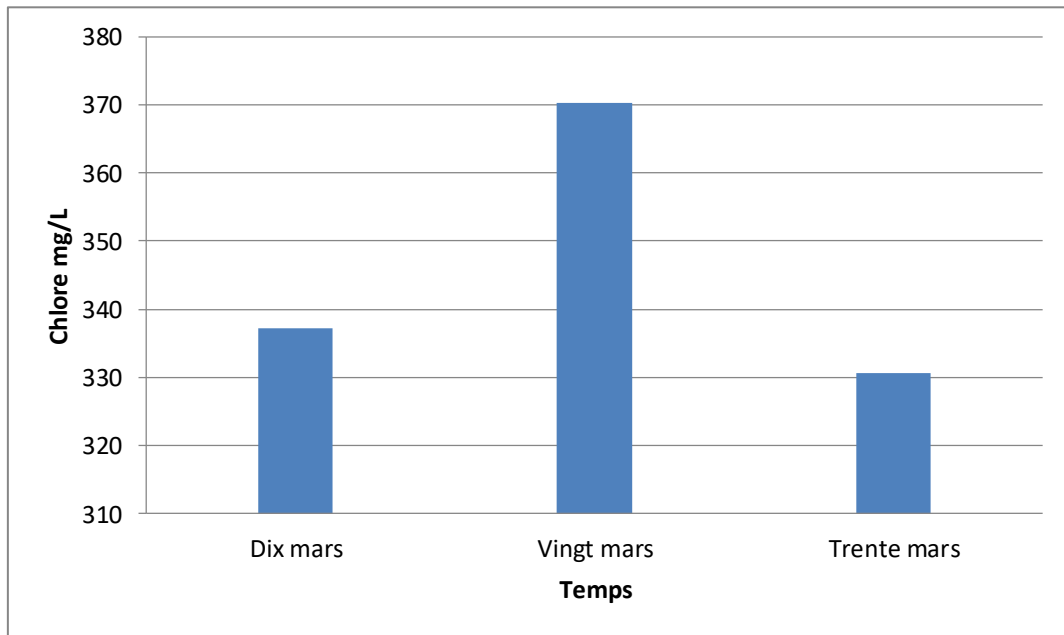


**2.9. Chlore (Cl<sup>-</sup>) :**

Le Chlore (Cl<sup>-</sup>) était à 337,25mg/L lors du premier prélèvement, au deuxième il était à 370,97mg/L, et au dernier il était à 330,54mg/L.

**La moyenne de Chlore (Cl<sup>-</sup>) était de 346,26mg/L.**

Les résultats sont représentés ci-dessous :



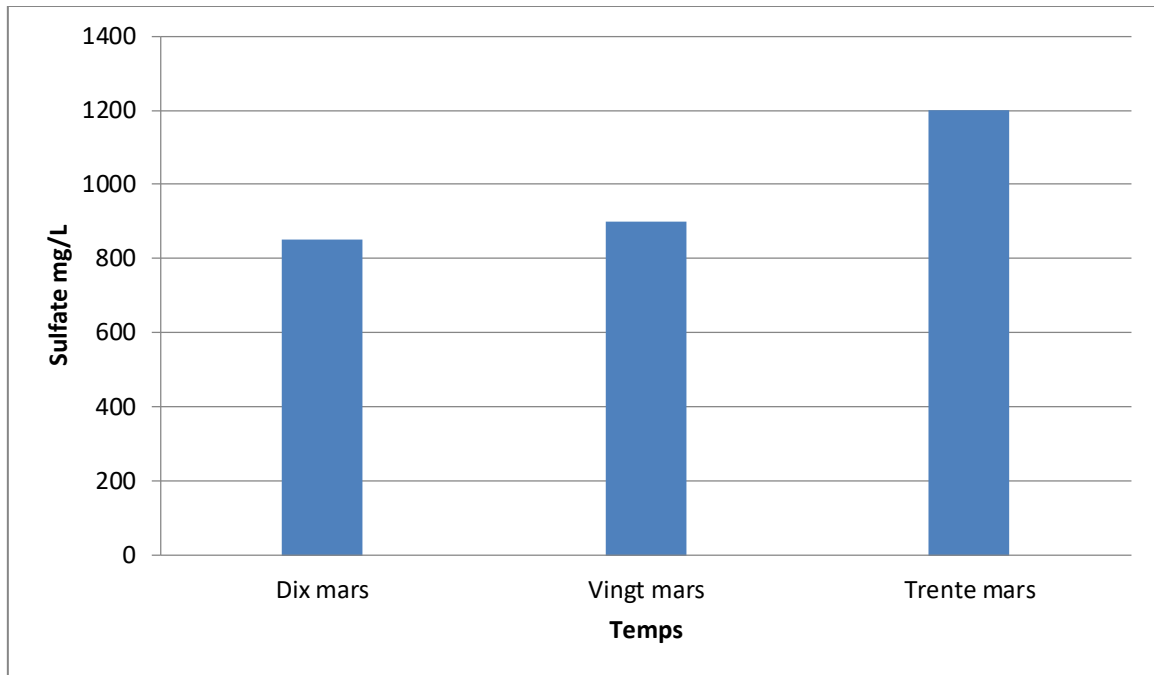
**Figure 30 :** Variation du Chlore (Cl<sup>-</sup>) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.

**2.10. Sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) :**

Lors du premier prélèvement le Sulfate était à 850mg/L, à 900mg/L au deuxième, et à 1200mg/L au troisième.

**La moyenne de Sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) était de 883,33mg/L.**

Les mesures du Sulfate sont représentées dans la figure suivante :



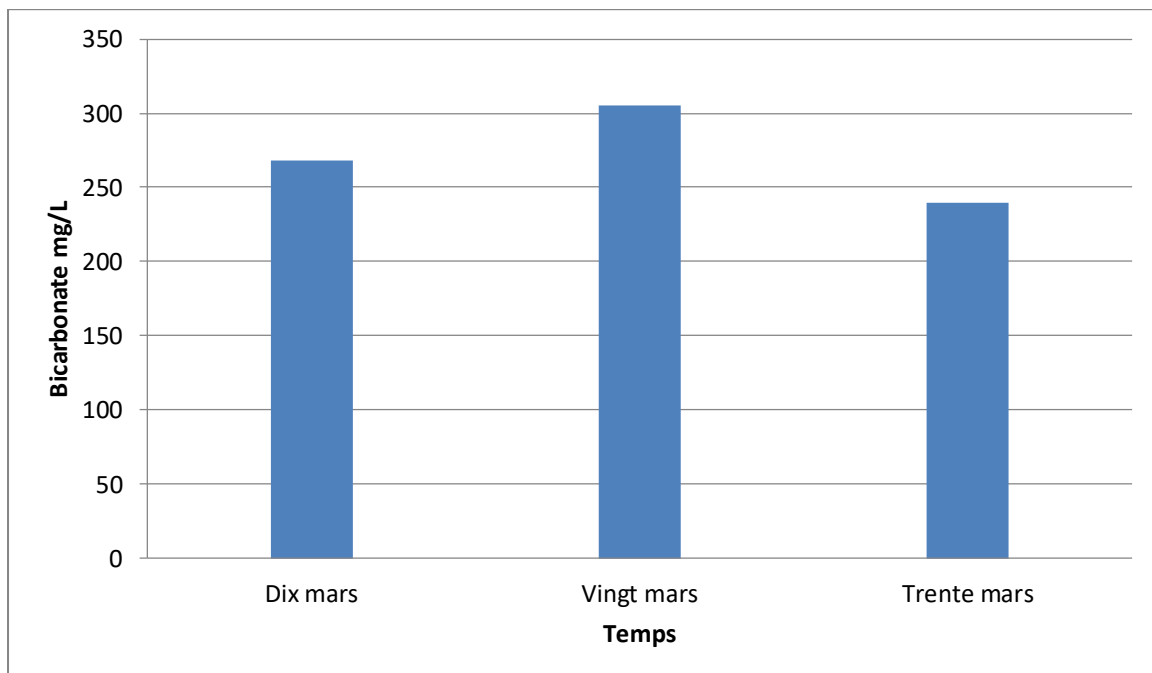
**Figure 31** : Variation du Sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) de Hamam Righa en fonction du temps.

**2.11. Bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) :**

Le 10/03/2022, la mesure du Bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) était à 268,4mg/L, le 20/03/2022 à 305mg/L et le 30/03/2022 à 240mg/L.

**La moyenne du Bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) était de 271,13mg/L.**

Les résultats sont ci-dessous :



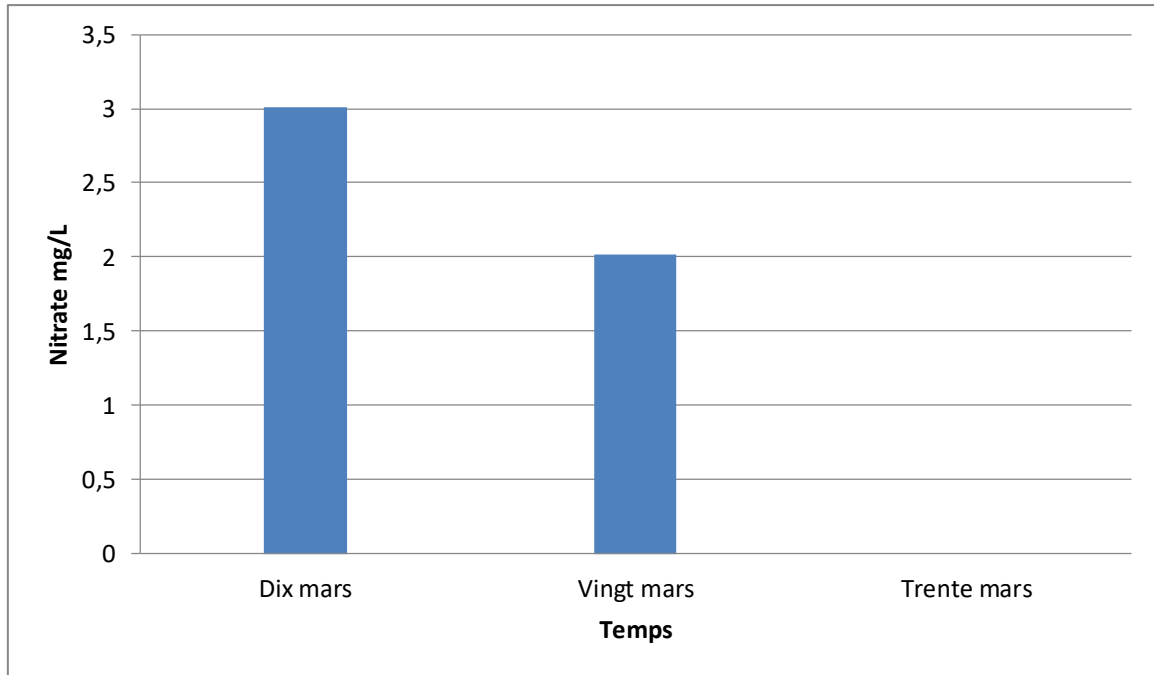
**Figure 32** : Variation du Bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.

**2.12. Nitrate ( $NO_3^-$ ) :**

Les mesures du Nitrate ( $NO_3^-$ ) étaient de 3,01mg/L lors du premier prélèvement, 2,02mg/L au deuxième et de 0 au dernier.

**La moyenne de Nitrate ( $NO_3^-$ ) était de 1,76mg/L.**

Les résultats sont dans la figure suivante :



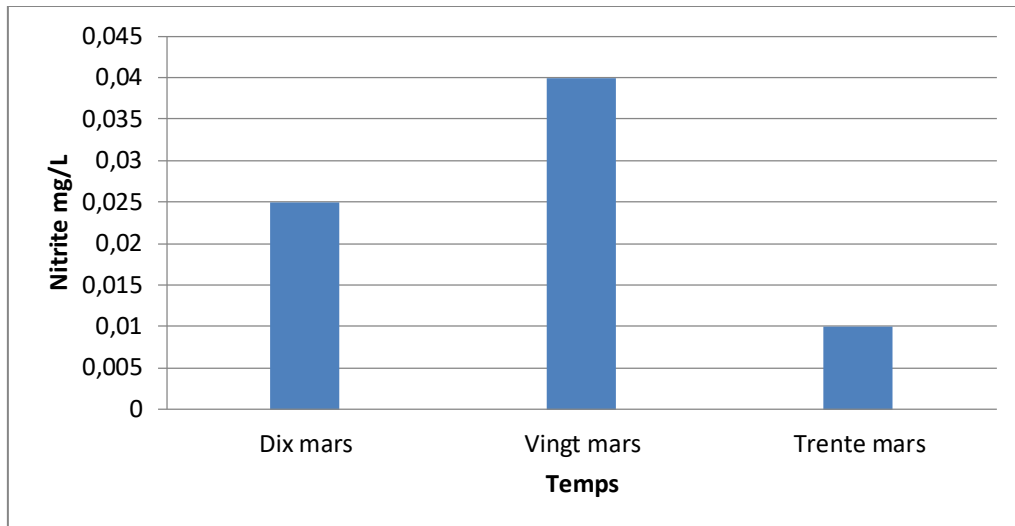
**Figure 33 :** Variation du Nitrate ( $NO_3^-$ ) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.

**2.14. Nitrite ( $NO_2^-$ ) :**

Le 10/03/2022, la mesure du Nitrite ( $NO_2^-$ ) était à 0.025mg/L, le 20/03/2022 elle était à 0.04mg/L, et au dernier prélèvement fait le 30/03/2022, elle était à 0.01mg/L.

**La moyenne du Nitrite ( $NO_2^-$ ) était de 0,025mg/L.**

La figure représente les résultats :



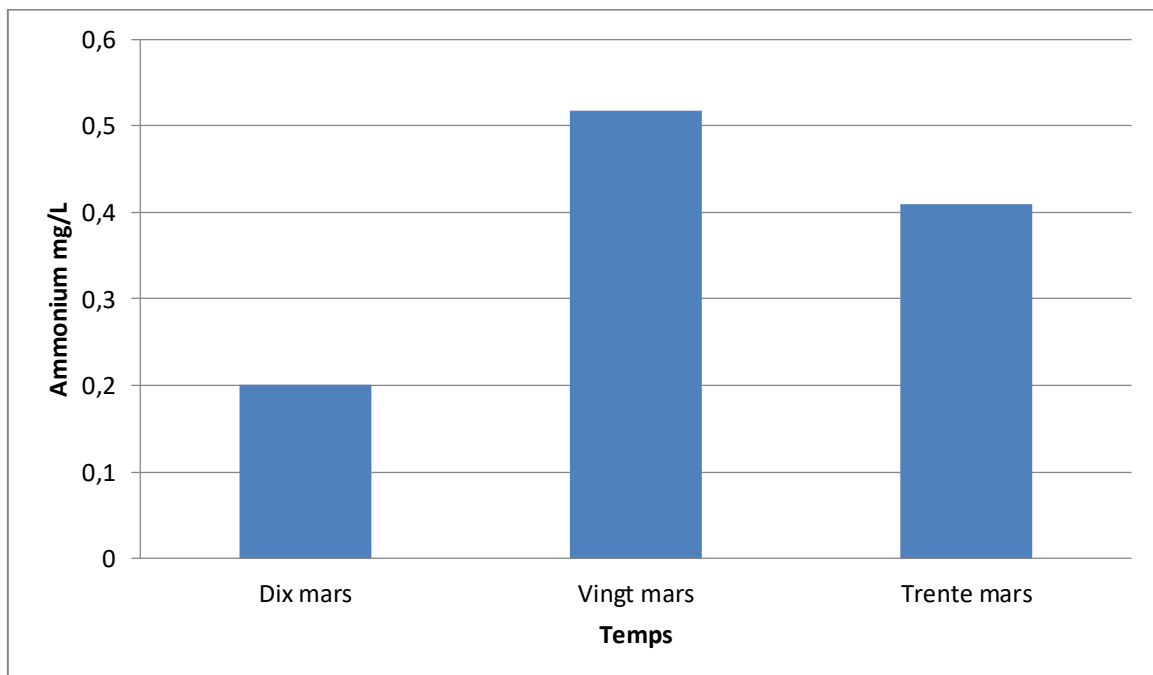
**Figure 34 :** Variation de Nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.

**2.15. L'Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) :**

La mesure de l'Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) dans le premier prélèvement était à 0,20mg/L, le deuxième prélèvement à 0,518mg/L et à 0,41mg/L au dernier.

**La moyenne de l'Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) était de 0,367mg/L.**

La figure ci-dessous présente les résultats :



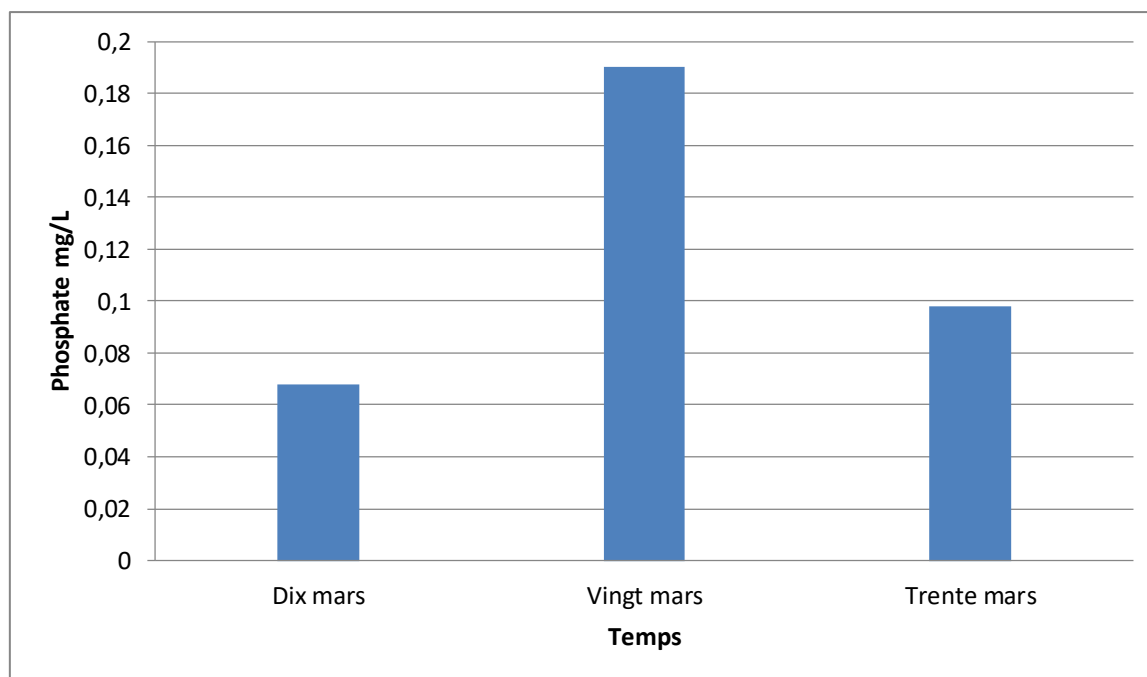
**Figure 35 :** Variation de l'Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.

**2.16. Phosphate ( $PO_4^{3-}$ ) :**

Le Phosphate ( $PO_4^{3-}$ ) était mesuré lors du premier prélèvement à 0,068mg/L, lors du deuxième à 0,19mg/L, et au troisième c'était à 0.098mg/L.

**La moyenne de Phosphate ( $PO_4^{3-}$ ) était de 0,118mg/L.**

La figure présente les mesures retrouvées :



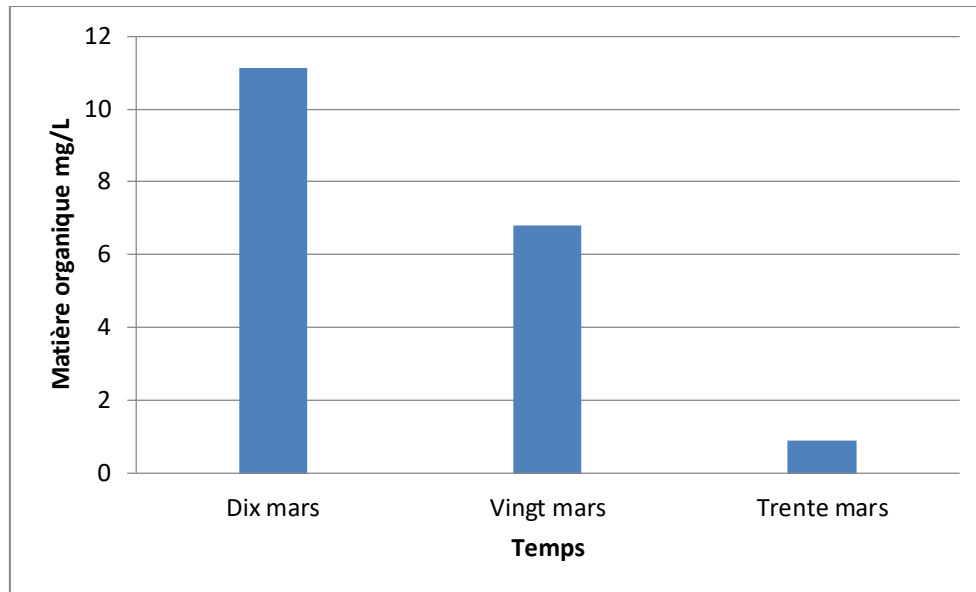
**Figure 36 :** Variation du Phosphate ( $PO_4^{3-}$ ) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.

**2.17. Matière organique :**

La matière organique était de 11,13mg/L le 10/03/2022, de 6,82mg/L le 20/03/2022 et de 0,9mg/L le 30/03/2022.

**La moyenne de la matière organique (MO) était de 6,28mg/L.**

La figure ci-dessous présente les résultats de la mesure de la matière organique :



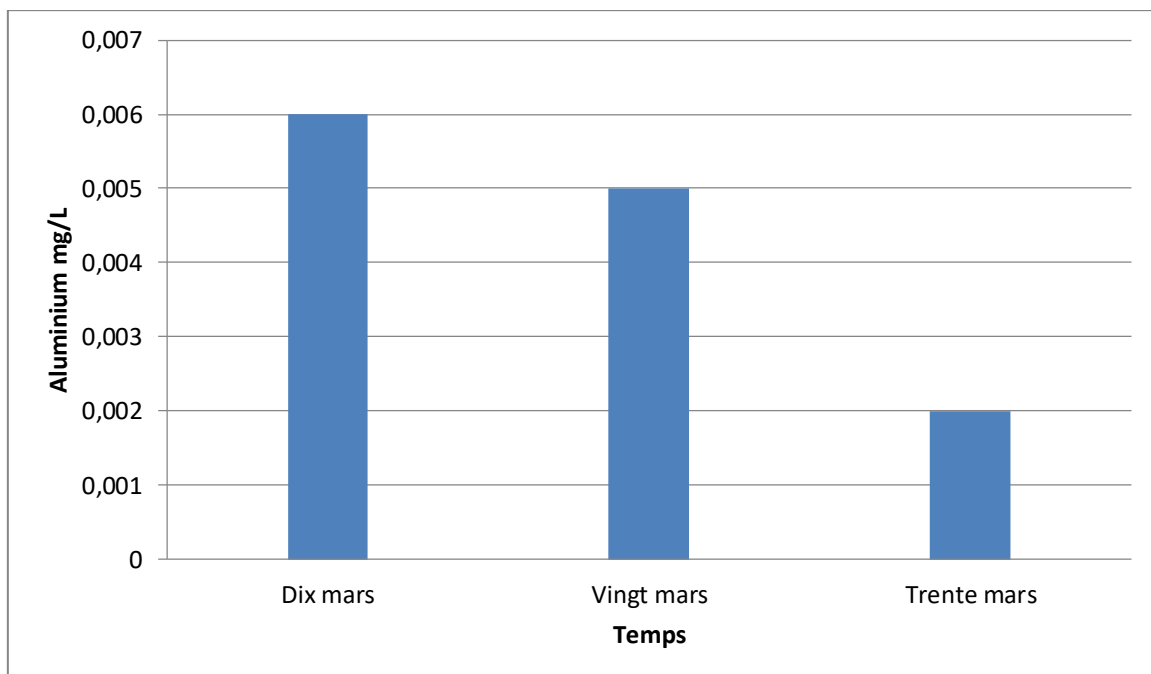
**Figure 37 :** Variation de la matière organique de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.

**2.18. Aluminium ( $Al^{3+}$ ) :**

L'Aluminium ( $Al^{3+}$ ) était de 0.006mg/L lors du premier prélèvement, de 0.005mg/L lors du deuxième et de 0.002mg/L au dernier.

**La moyenne de l'Aluminium ( $Al^{3+}$ ) était de 0,004mg/L.**

Les résultats sont représentés dans la figure suivante :



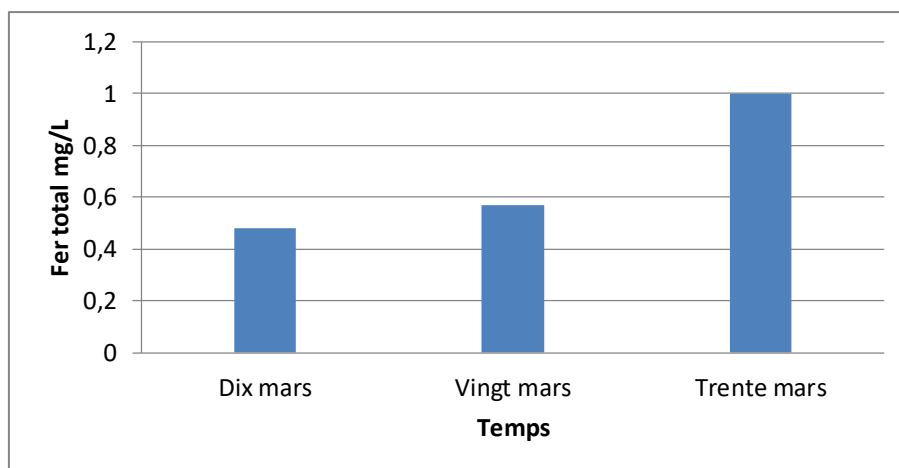
**Figure 38 :** Variation de l'Aluminium ( $Al^{3+}$ ) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.

**2.19. Fe (total) :**

Le fer total du premier prélèvement effectué le 10/03/2022 était à 0,48mg/L, au deuxième fait le 20/03/2022 à 0,57mg/L, et au dernier à 1mg/L.

**La moyenne du Fer était de 0,68mg/L.**

Les résultats ci-dessous montrent les mesures de Fer (Fe total) des trois prélèvements :



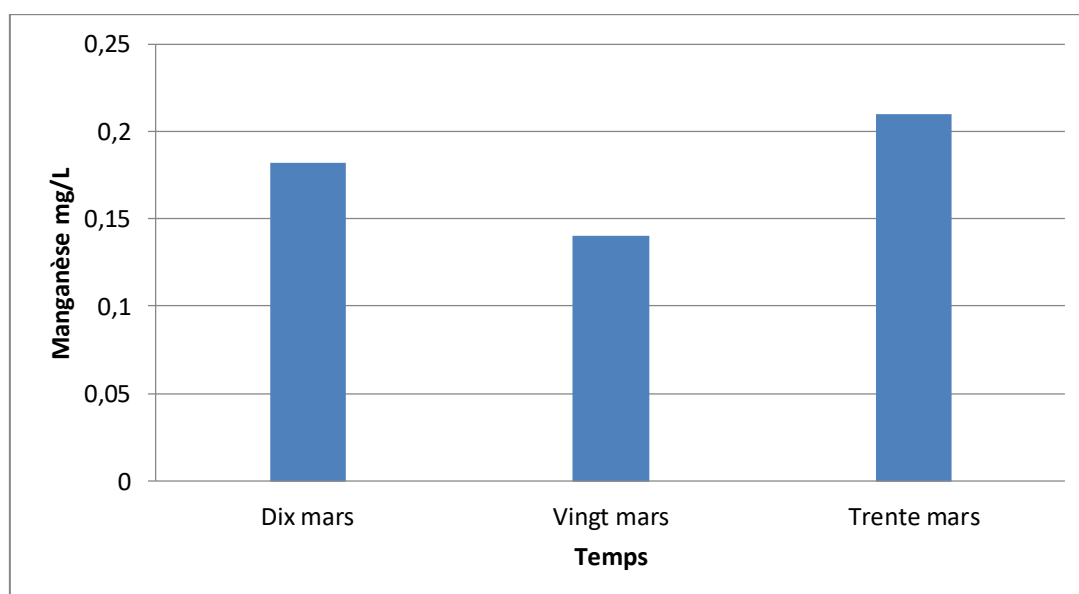
**Figure 39 :** Variation du Fe (total) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.

**2.20 Manganèse (Mn<sup>2+</sup>) :**

La mesure de Manganèse (Mn<sup>2+</sup>) était de 0,182mg/L lors du premier prélèvement, de 0,14mg/L lors du deuxième et 0,21mg/L lors du dernier.

**La moyenne de Manganèse (Mn<sup>2+</sup>) était de 0,177mg/L.**

La figure suivante montre les résultats :



**Figure 40 :** Variation de Manganèse (Mn<sup>2+</sup>) de l'eau thermale Hamam Righa en fonction du temps.

Les caractéristiques physico-chimiques sont présentes dans l'eau thermale et sont dépendantes de leurs parcours géologiques. L'origine de leurs bienfaits thérapeutiques est les sels minéraux, boues et gaz (**Bouanane-Darenfed, 2012**).

Au moment des prélèvements, l'eau de la source Hammam Righa était légèrement trouble, jaunâtre et présentant des matières en suspension. Les échantillons d'eau n'avaient aucune odeur particulière (hydrocarbures, rejets d'égout), et ne présentaient aucun signe de pollution apparente.

La turbidité a été mesurée à 8,52NTU lors du premier prélèvement, et lors du deuxième prélèvement c'était une turbidité élevée avec 20,1NTU et pour le dernier prélèvement c'était plus inférieur avec une turbidité de 5,4NTU. La turbidité d'une eau traduit la présence de matières en suspension des substances en solution comme les substances minérales (sables et argiles). Ou des matières organiques (matière organique morte ou des végétaux en décomposition, du plancton suspendu). (**Rodier et al., 2005**).

Le premier prélèvement de la matière organique était plus élevé que les deux autres prélèvements. Selon (**Rodier et al., 2005**), les matières organiques susceptibles d'être rencontrées dans l'eau sont constituées par des produits de décomposition d'origine animale ou végétale, élaborés sous l'influence des littératures.

Lors du premier prélèvement le Sulfate était à 850mg/L, à 900mg/L au deuxième, et à 1200mg/L au troisième. La concentration en ions sulfate des eaux naturelles est très variable, et peut être largement dépassée dans les zones contenant du gypse ou lorsque le temps de contact avec la roche est élevé permettant la dissolution des gypses. (**Boucareb et al., 2012, Rodier et al., 2005, Dib et al., 2009**).

Les mesures du Nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) étaient de 3,01mg/L lors du premier prélèvement, 2,02mg/L au deuxième et de 0 au dernier. Selon (**Rodier et al., 2005**), toutes les formes d'azote sont susceptibles d'être à l'origine des nitrates par un processus d'oxydation biologique. Dans les eaux naturelles non polluées, le taux de nitrate est très variable suivant la saison et l'origine des eaux (**Rodier et al., 2005**).

Différents types de classifications ont été proposés pour désigner les eaux thermales et minérales. On peut les classer en fonction du pH, de la température de l'eau à l'émergence ou encore de la valeur de leur conductivité.

La température est une caractéristique majeure des eaux étudiées, et c'est un facteur important dans l'environnement aquatique car elle contrôle presque toutes les réactions physiques, chimiques et biologiques (**Chapman et Kimstach, 1996**). Les températures au moment de l'étude des eaux étaient environ de 62,33 °C à Hammam Righa. Dans une étude de **Bouacem**



**Khelifa** en 2016 pour Hamam Righa, elle était de 68°C, pour Hamam Melouane de la même étude elle était de 39,5°C. En 2022, **Boudoukha** et **Athamena** ont fait

l'étude sur Hamam Setif et ont trouvé la température à 42,3°C. **Bencheikh**, le 2012 a fait un analyse des eaux thermales en 2 lieux (Hamam Zelfana, El-Charef) et a trouvé la température respectivement à 45-45,2°C, 45,1-46,4°C.

La température de Hamam Righa est supérieure à toutes les sources précisées précédemment. La température de l'eau minérale chaude dépend de plusieurs facteurs : réactions chimiques exothermiques, décomposition des minéraux radioactifs, gradients géothermiques et mouvements de la croûte (**Saibi, 2009 ; Tarcan et Gemici, 2003**).

Les mesures de pH effectuées sur les prélèvements d'eau permettent d'approuver leur état acide, neutre ou basique. Les pH des eaux de (Hamam Righa et Hamam Melouane, Hamam Setif, Hamam Zemzem, Hamam El-Charef, Hamam Zelfana) s'approchent de la neutralité. Les valeurs du pH se situent entre 6 et 8.5 dans les eaux naturelles. (**Chapman et Kimstach, 1996**).

Le pH augmente quand c'est la période d'étiage, et quand l'évaporation est considérable et elle diminue en présence des teneurs qui sont élevées en matière organique. (**Maybeck et al., 1996**).

La turbidité est la réduction de la transparence d'un liquide due à la présence de matières en suspension. Les eaux de notre étude de Hamam Righa était d'une moyenne de 11,34NTU, c'est beaucoup moins que celle de l'année 2016 avec 41,2NTU de turbidité (**Bouacem et al., 2016**). Celle de Hamam Melouane était supérieure avec une moyenne de 70,4NTU (**Bouacem et al., 2016**). La turbidité des trois Hamam (Zemzem, El-Charef, Zelfana) était entre 0,1-0,8NTU (**Bencheikh et al., 2012**). La conductivité donne une idée de la minéralisation d'une eau. Elle dépend des charges de matière organique endogène et exogène, génératrice de sels après décomposition et minéralisation et également avec le phénomène d'évaporation qui concentre ces sels dans l'eau, elle varie aussi suivant le substrat géologique traversé. On note une conductivité de 3196  $\mu\text{S}/\text{cm}$  pour l'eau étudiée (Hamam Righa). Elle était à 2500  $\mu\text{S}/\text{cm}$  en 2016 (**Bouacem et al., 2016**). Hamam Melouane est d'une conductivité de 3300  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (**Bouacem et al., 2016**), de 2750  $\mu\text{S}/\text{cm}$  pour Hamam El-Charef, 2770  $\mu\text{S}/\text{cm}$  pour Hamam Zelfana et 1014  $\mu\text{S}/\text{cm}$  pour le Hamam de Zemzem (**Bencheikh et al., 2012**). Les valeurs élevées enregistrées pour les eaux pourraient être liées aux formations géologiques traversées par ces eaux qui leur procurent une très forte minéralisation.

La dureté de l'eau s'exprime par sa teneur en ion calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Ces éléments sont présents dans l'eau étudiée (Hamam Righa) avec 449,33mg/L et 58,14mg/L qui

est supérieure à celle de Hamam Righa en 2016, El-Charef, Zelfana, Zemzem, Setif avec une quantité 320 mg/L et 30,6 mg/L, 177,1mg/L et 41,9mg/L, 168,33mg/L et 78 ,44mg/L, 96,12mg/L et 14,6mg/L (**Bencheikh et al., 2012**) et 8,8mg/L et 4,8mg/L (**Boudoukha et al., 2022**) respectivement.

Les eaux thermales contiennent du sodium et du chlore. A Hammam Righa, les quantités étudiées sont moins importantes. Le sodium est constamment présent dans l'eau en quantités très variées ; il provient principalement de la lixiviation de formation. Les dépôts géologiques contenant du chlorure de sodium et des minéraux silicatés comme le plagioclase. Le potassium est un minéral et le sodium est nettement moins abondant.

Les bicarbonates peuvent être trouvés dans les eaux thermales d'une quantité assez abondante en incluant l'eau étudiée de Hamam Righa sauf pour le Hamam Sétif. Ils sont le produit de la désintégration, l'apport atmosphérique de cet élément provient de roches calcaires ou d'émanation de magma profond. La forte teneur en ions sulfate de ces eaux thermale révèle leur origine sédimentaire. Cependant, il est important de souligner que les eaux de Hammam Righa contiennent du soufre.

En ce qui concerne les teneurs en éléments nutritifs à base de phosphore et d'azote (nitrates, nitrites et ammoniums), ces eaux thermales sont faibles, ce qui témoigne de l'absence de toute source de pollution.

Le fer est présent dans l'eau étudié mais en faible quantité, semblable aux autres sources thermales (Hammam Righa, Hamam Setif, Hamam Zemzem, Hamam El-Charef, Hamam Zelfana) sauf pour Hammam Melouane avec un niveau plus élevé 2,80 mg/L (**Bouacem et al., 2016**).

D'après les résultats des différentes eaux thermale, on constate qu'elles ont une faible concentration et des métaux lourds non toxiques mais suffisantes pour provoquer des effets thérapeutiques (fer, manganèse.....). A travers leurs thermalisme et leurs compositions chimiques, l'eau étudié (Hamam Righa) et les différentes eaux thermales précisées précédemment (Hamam Righa en l'année 2016, Hamam Melouane, Hamam Setif, Hamam Zemzem, Hamam El-Charef, Hamam Zelfana) peuvent produire des effets thérapeutiques intéressants, le traitement de diverses maladies (estomac, intestin, vésicule biliaire, etc.).

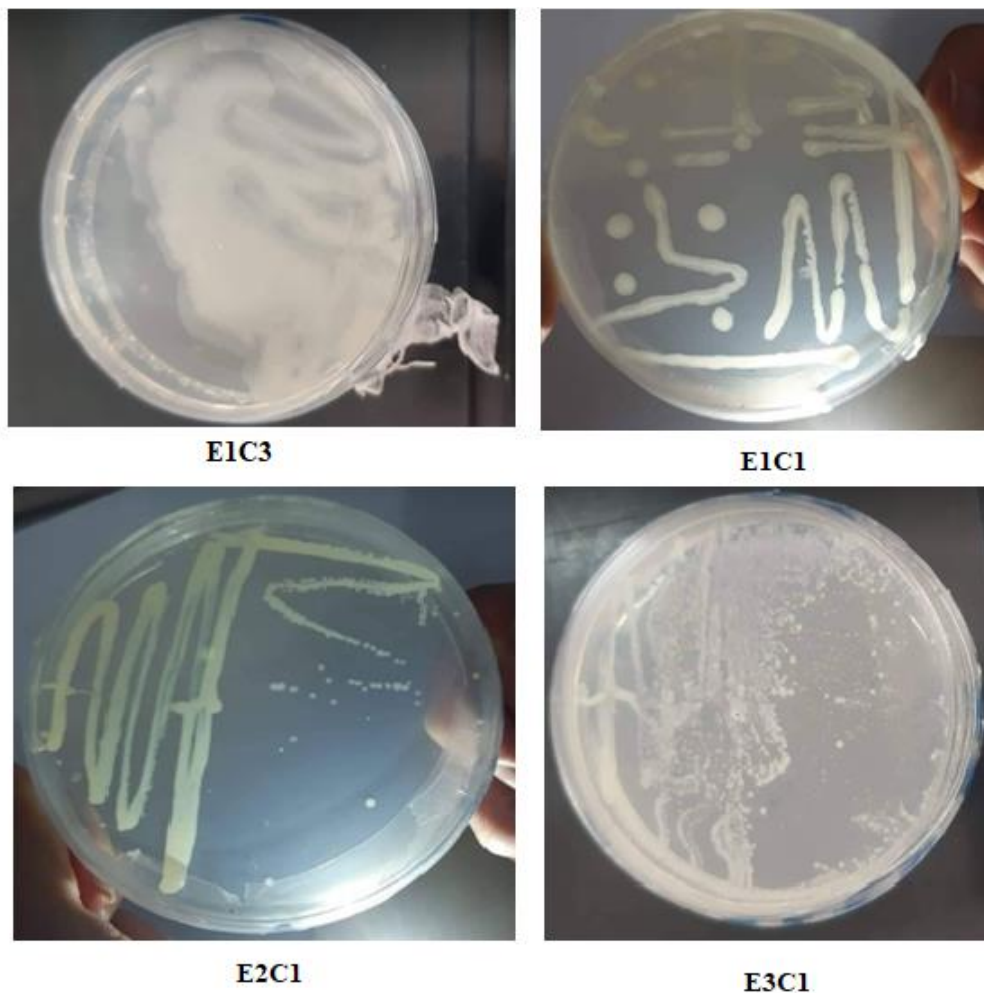
**2.Détermination des caractéristiques phénotypiques :**

**2.1 .Caractéristiques morphologiques et culturelles :**

**2.1.2. Caractères culturels : Aspect macroscopique :**

Les milieux de culture ayant servi à l'isolement de ces isolats sont la gélose nutritive et le bouillon nutritif, des milieux usuels pour l'isolement d'une panoplie de microorganismes. Ce qui laisse entendre que ces bactéries sont chimio-organotrophes et ne nécessitent pas la présence de milieux enrichis, des vitamines, ou encore des acides aminés. Ces résultats sont similaires à ceux de **Mohammad *et al.*, (2017)**.

Les colonies obtenues sont généralement rondes, d'une couleur crème. Leur consistance est généralement crémeuse. Les colonies de l'isolat (E1C3) est rugueux et le reste est lisse. Les aspects macroscopiques dans les figures suivantes.



**Figure 41:** L'aspect macroscopique de chaque isolat.

La description morphologique des colonies des isolats est rapportée dans le tableau suivant :

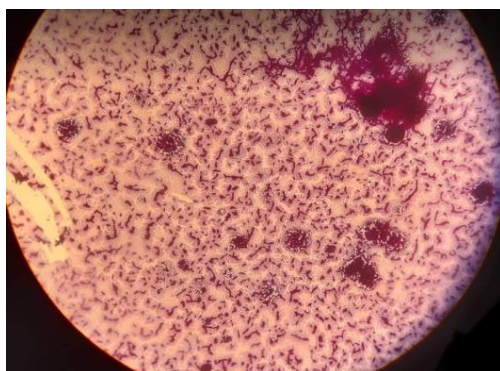
**Tableau 5 :** Caractéristiques culturelles des isolats thermophiles étudié.

Souche	Forme	Relief	Contour	Taille	Surface	Couleur	Opacité	Consistance
E1C3	Circulaire	Convexe	Régulier	Petite	Rugueuse	Crème	Opaque	Crémeuse
E2C1	Circulaire	Convexe	Régulier	Petite	Lisse	Crème	Opaque	Crémeuse
E3C1	Circulaire	Bombé	Régulier	Petite	Lisse	Crème	Opaque	Muqueuse
E1C1	Circulaire	Convexe	Régulier	Petite	Lisse	Crème	Opaque	Muqueuse

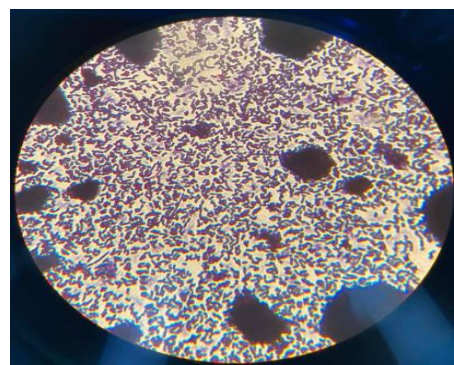
**2.1.1 Caractères morphologique : Aspect microscopique :**

La détermination de la morphologie, de l'arrangement cellulaire ainsi que le Gram de ces isolats thermophiles (E1C1, E1C3, E2C1 et E3C1) ont été déterminé en les réalisant sur des cultures jeunes (24 heures d'incubation) cultivées à 55°C sur une gélose nutritive (GN) dans une atmosphère humide.

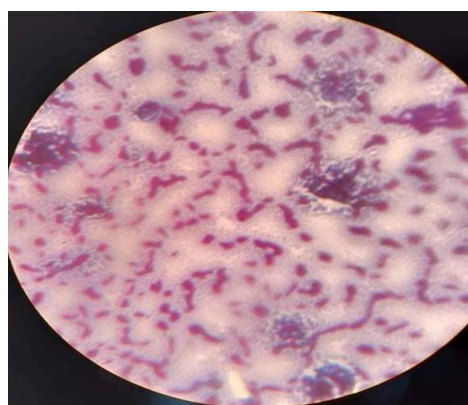
L'état frais des isolats a montré que les trois isolats (E1C1, E1C3 et E3C1) se présentaient sous formes de bacille, sauf le quatrième (E2C1) qui est sous forme coccobacille. La coloration de Gram a révélé que les quatre isolats (E1C1, E1C3, E2C1 et E3C1) ont été classés dans le groupe de bactéries à Gram négatif.



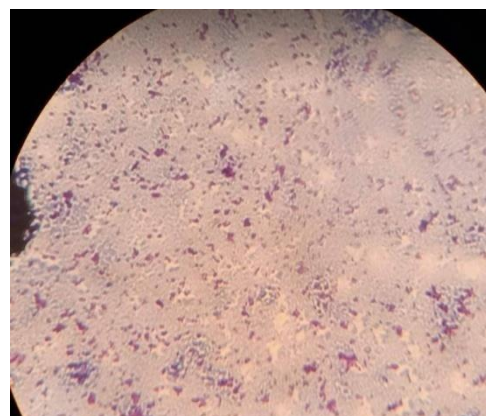
**E1C1**



**E1C3**



**E2C1**



**E3C1**

**Figure 42 :** L'aspect microscopique de chaque isolat x40.

**2.2.1. Test Oxydase et Catalase :**

Le test catalase a révélé que les quatre isolats (E1C1, E1C3, E2C1 et E3C1) sont positifs, tandis que pour le test d'oxydase, cela a montré que les trois isolats (E1C1, E1C3, E2C1) sont positifs tandis que le E3C1 est négatif (**voir tableau ci-dessous**).

**Tableau 6 : Les résultats des souches pour le test d'oxydase et catalase.**

<b>Souche</b>	<b>E1C3</b>	<b>E2C1</b>	<b>E3C1</b>	<b>E1C1</b>
<b>Catalase</b>	+	+	+	+
<b>Oxydase</b>	+	+	-	+

**2.2.2 .Plaque API 20E :**

L'identification biochimique par l'utilisation des plaques API20E incubées à 55°C sous atmosphère humide nous a permis d'identifier différentes espèces E1C3, E2C1, E3C1, E1C1 (*Pseudomonas horyzihabitans*, *Pasteurella pneumotropica*, *Stenotrophomonas Maltophilia*, *Ochrobatrium anthropi* ) avec des biotypes différents. (**Figure 41**)

**Tableau 7 : Le biotype de chaque isolat.**

<b>Isolat</b>	<b>E1C3</b> <i>(Pseudomonas horyzihabitans)</i>	<b>E2C1</b> <i>(Pasteurella pneumotropica)</i>	<b>E3C1</b> <i>(Stenotrophomonas maltophilia)</i>	<b>E1C1</b> <i>(Ochrobatrium anthropi)</i>
<b>Biotype</b>	<b>0001000</b>	<b>0014000</b>	<b>0002000</b>	<b>0010000</b>

Les autres tests biochimiques ont été réalisés en utilisant la plaque API 20 incubée à 55°C sous atmosphère humide.

Le test de l'enzyme uréase (**URE**) s'est avérée positive pour les deux isolats (**E2C1, E1C1**). Les autres isolats (**E3C1, E1C3**) négatifs. Ce résultat peut être expliqué par la production d'ammoniac par les bactéries.

Les résultats de la recherche du test de Voges-Proskauer (**VP**) étaient positifs seulement pour un seul isolat (**E1C3**). Ce résultat prouve la présence de l'acétoïne (acétylméthylcarbinol) qui a été produit par la fermentation du glucose par ses bactéries utilisant la voie du butylène glycol.

Le test (**GEL**) était positif seulement pour l'isolat (**E3C1**) dû à la production de l'enzyme gélatinase qui liquéfie la gélatine.

Le test (**GLU**) s'est avéré positive pour l'isolat (**E2C1**) car les bactéries ont fait la fermentation du glucose (sucre hexose).

Pour les autres tests (ONPG, ADH, LDC, ODC, CIT, H<sub>2</sub>S, TDA, IND, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA) les résultats étaient négatifs.

Les résultats du test de la galerie API 20E de la source thermale de Hamam Righa a permis d'identifier 4 souches bactériennes (*Pseudomonas horyzihabitans*, *Pasteurella pneumotropica*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Ochrobactrum anthropi*).

A partir des sources chaudes Tina et Bonta au Mexique, **Prieto-Barajas** et ses collègues en **2017** ont identifié un groupe dominant de *Bacillus* qui comprenait l'espèce *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus pumilus*. Les espèces fréquentes étaient *Bacillus megaterium*, *Bacillus vietna-mensis*, *Bacillus boroniphilus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus*.

Selon l'étude de **Verma** et ses collègues en **2018** de la source chaude de Leh en région du Ladakh en Inde. Trois souches ont été identifiées de la famille *Bacillus* (*B. subtilis*, *Bacillus sp* et *B. licheniformis*).

L'étude de *Aissaoui Nadia* en **2019**, de la source hydrothermale de Dbagh, deux souches de *Bacillus* ont été déterminé (*Bacillus licheniformis* et *Bacillus sonorensis*).

**Saghatelyan** et ses collaborateurs en **2021**, ont fait une étude à partir des sources géothermiques terrestres à Arménie et Haut-Karabakh et ont trouvé plus de 22 espèces distinctes appartenant aux genres *Aeribacillus*, *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Parageobacillus*, *Paenibacillus* et *Ureibacillus*.


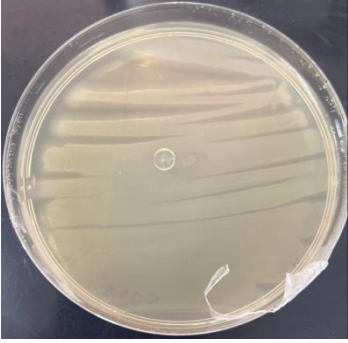

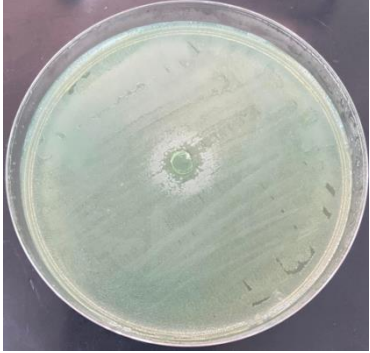
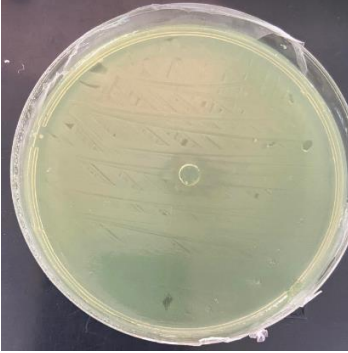
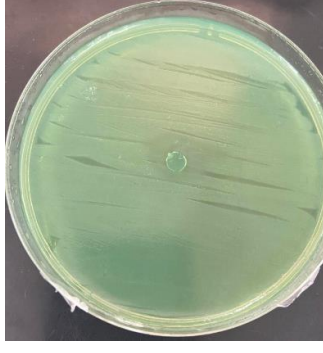

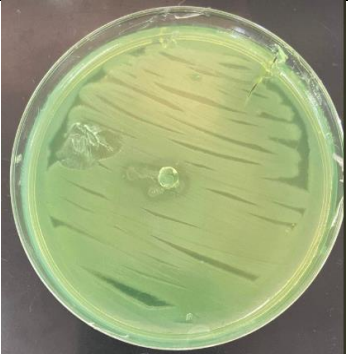

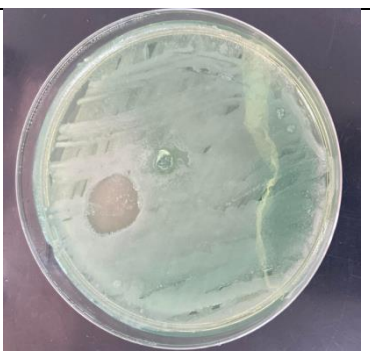
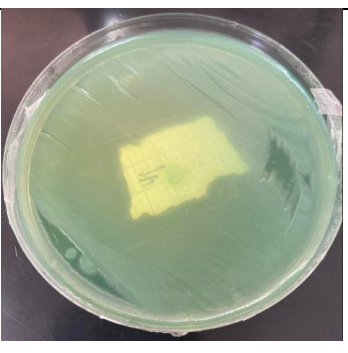
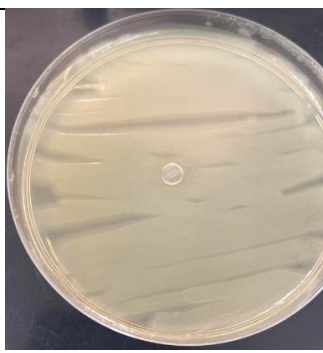
Nos résultats des souches de Hamam Righa n'ont pas de corrélation avec les résultats précédents.

### **3. Activité antimicrobienne vis-à-vis des souches de références :**

#### **Screening primaire :**

Le screening préliminaire de l'activité antibactérienne a été effectué par la technique du cylindre de gélose extrait de la gélose nutritive. La sélection des souches test pour ces activités antimicrobiennes a été réalisée afin d'obtenir un représentant de chaque classe. Dans cette étude, des souches Bacilles et une coccobacille ont été utilisées pour évaluer l'effet antagoniste de nos isolats contre des bactéries de références.

**Tableau 8** : Résultats de l'activité antimicrobienne des isolats vis-à-vis des souches de références.

	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
<b>E1C3</b>			
<b>E2C1</b>			
<b>E3C1</b>			
<b>E1C1</b>			

Les résultats préliminaires du screening sont présentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 9:** Résultats du screening primaire (diamètre de cylindre 5 mm obtenus à 55°C après 48 heures d'incubation.

Echantillons	Souches de références		
	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
<b>E1C3</b>	14	19	9
<b>E2C1</b>	15	10	8
<b>E3C1</b>	20	18	12
<b>E1C1</b>	0	0	0

\**S.aureus* : *Staphylococcus aureus* ATCC25923

\**E.coli* : *Escherichia coli* ATCC 25922

\**P.aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Les résultats montrent que les isolats thermophiles (**E1C3**, **E2C1** et **E3C1**) possèdent un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de toutes les bactéries test à Gram positif sauf un seul isolat (**E1C1**).

Le plus grand diamètre était à 20mm vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* obtenu à partir de l'isolat (**E3C1**).

L'activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries à Gram négatif a été elle aussi observée, les isolats (**E1C3**, **E2C1** et **E3C1**) étaient actives vis-à-vis *d'Escherichia coli* sauf un seul isolat (**E1C1**) avec des diamètres de 19mm, 10mm et 18mm respectivement. Une activité vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* a été aussi observée pour l'ensemble des isolats thermophiles (**E1C3**, **E2C1** et **E3C1**) avec des diamètres de 9mm, 8mm et 12mm.

Les résultats de l'activité antibactérienne de nos isolats (4 souches) montrent que trois souches (*Pseudomonas horyzihabitans*, *Pasteurella pneumotropica*, *Stenotrophomonas maltophilia*) ont eu une activité contre les souches bactériennes utilisés (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) lors du test sauf une souche isolée (*Ochrobactrum anthropi*).

Selon l'étude de **Yakhlaf** et ses collaborateurs en **2012**, Les trois souches de *Pseudomonas* sp isolées à partir d'une source hydrothermale en Algérie étaient actives contre au moins un des quatre bactéries de références (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus*



ATCC 43300, *Echerichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) utilisait pour l'activité antimicrobienne.

En **2017**, **Shakhatreh** et ses collègues ont fait une étude antimicrobienne à la source hydrothermale Al-Ain Alhara et ont isolées 5 souches d'*A.flavithermus*. Il y avait la présence d'une activité antimicrobienne pour certains souches cliniques à Gram négatif (*Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Haemophilus influenzae*, *Pseu-domonas aeroginosa*) et certain Gram positif (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, et *Candida albicans*).

Le screening primaire des composés antimicrobiens de deux souches de *Bacillus* (*Bacilluslicheniformis* et *Bacillus sonorensis*) isolés à partir d'une source hydrothermale Dbagh vis-à-vis d'une gamme de microorganismes ATCC (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et les *Candida* ATCC) par **Aissaoui en 2019**. Les deux souches de *Bacillus* présentent une activité antimicrobienne très importante vis-à-vis des bactéries à Gram négatif, Gram-positif et les *Candida* ATCC.

Récemment en **2022**, une recherche a été faite par **Octarya et al**, quarante-quatre souches ont été isolées et purifiées à partir des sources chaudes de Rimbo Panti à l'ouest de Sumatra, elles ont été testées pour leur capacité antimicrobienne vis-à-vis des souches de références (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 35218, et *Candida albicans* ATCC 10231). La souche *Bacillus Paramycoïdes* a eu une activité anti-microbienne très élevée contre les souches de références.

Nos résultats sont en concordance avec l'étude de Yakhlaf et plusieurs études antérieures confirment la capacité de micro-organismes thermophiles isolés des sources chaudes terrestres de produire des substances antibactériennes actives contre micro-organismes pathogènes (**Khalil et al., 2006 ; Novotny et Perry, 1992 ; Muriana et al., 1991**).

L'un des domaines d'intérêt est l'utilisation de ces molécules antimicrobiennes est l'élimination des micro-organismes qui sont responsable de la détérioration des aliments ou de la pathogénicité liée aux aliments (**Novotny et Perry, 1992**).

***CONCLUSION***

***ET***

***PERSPECTIVES***

### Conclusion et perspectives :

Nos recherches s'inscrivent dans le cadre des travaux de recherche sur le développement des ressources thermales algériennes à visée thérapeutique et explorer ces communautés microbiennes et leurs caractéristiques physico-chimiques afin de découvrir des nouvelles espèces bactériennes et de nouvelles biomolécules associées à ces écosystèmes uniques.

Les extrêmophiles sont des micro-organismes potentiels appliqués dans de nombreux domaines : agriculture, industrie, médecine, cosmétique. Ces micro-organismes thermophiles avec une température supérieure à 50°C sont l'un des extrêmophiles les mieux étudiés, allant de leurs enzymes extrêmement thermostables trouvés dans différents environnements d'applications car leurs propriétés surpassent celles de leurs homologues mésophiles.

Les paramètres physico-chimiques obtenus ont une conductivité élevée (entre 3173 et 3200 $\mu$ s/cm), Calcium ionique (400 à 468 mg/L), Magnésium (50,5 à 70,47 mg/L) et Sulfate (850 et 900mg/l), augmentant ainsi le degré de minéralisation et confirmant les propriétés en émoion dermatologie et métabolisme de nature sulfatée-calcique de l'eau thermale de Hammam Righa.

Un screening de quatre isolats a été effectué dans cette étude et a été extrait à partir d'échantillons d'eau de la source thermale de Hammam Righa (Ain Defla) (65°C).

Notre étude représente un travail fondateur sur cette source et nos points de recherche étaient les suivantes :

- L'analyse des caractéristiques physico-chimiques de l'eau thermale.
- La caractérisation microbiologique de l'eau de la source.
- L'étude phénotypique des isolats
- Détermination des tests biochimiques.
- L'activité anti-microbienne vis-à-vis des souches de références (Screening primaire).

En vue de l'importance des microorganismes thermophiles et leur capacité à résister aux conditions extrêmes, notre thématique ouvre des perspectives diverses:

- Faire un criblage enzymatique des souches isolées afin de sélectionner les souches performantes pour la production d'enzymes thermostables.

- Exploiter la biodiversité des microorganismes thermophiles par des méthodes culturales et non culturales.
- Caractériser de nouveaux gènes avec un haut rendement, les cloner pour produire des enzymes recombinantes afin d'augmenter la production industrielle.
- Compléter notre étude par l'analyse phylogénétique avec d'autres outils moléculaires tels que l'hybridation ADN-ADN et l'électrophorèse enzymatique multilocus (MLEE).
- Formuler des conditions de culture qui reflètent l'habitat naturel des microorganismes afin de mieux préserver en termes de capacités la production de métabolites secondaires.
- Purifier les extraits bruts en utilisant des méthodes de chimie analytique très sensibles et reproductibles.

***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

- **AISSAOUI Nadia, (2019).** "Identification et caractérisations des *Bacillus* thermophiles isolés à partir de la source hydrothermale Dbagh, producteurs de composés antimicrobiens .Diss. Alger.
- **Aissaoui, N., Arab, M., Bakour, S., Nas, F., Hoceini, A., Fournier, P.E. and Klouche-Khelil, N.( 2018).** Diversity of aerobic bacillian alysis usin gmolecular and culture-based approaches in Debagh hot spring (Algeria). Geo microbiology Journal, Doi:10.1080/01490451.2018.1520937.
- **Alain, K., Geslin, C., Godfroy, A., Prieur, D. (2010).** Les thermophiles. [En ligne] :[https://wwz.ifremer.fr/content/download/12612/file/fiche\\_big2010\\_thermophiles](https://wwz.ifremer.fr/content/download/12612/file/fiche_big2010_thermophiles).
- **Ali, Toudert. (2008).** "Les thermes et le thermalisme en Algerie." La Revue des Sciences Commerciales 7.2: 11-26.
- **Antranikian, G. (2009).** "Extremophiles and biotechnology."
- **Antranikian, Garabed. (2007).** "Industrial relevance of thermophiles and their enzymes." Thermophiles. CRC Press, 127-174.
- **Bérdy, János. (2012):** "Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading." The Journal of antibiotics 65.8 :385-395.
- **Biomérieux, (2006).** Applications Bio Pharmaceutiques [en ligne]. Disponible sur:<http://www.biomerieux.fr/servlet/srt/srt/bio/france/dyn>.
- **Bouacem, Khelifa, (2016).** Caractérisation de souches bactériennes isolées à partir de sources thermales du Nord-Algérien. Diss. Faculté des Sciences Biologiques.
- **Bouanane, Nabila-Amel, (2012.).** Approches culturelles et moléculaires de la diversité bactérienne de sources hydrothermales Algériennes. Diss. Alger.
- **Bouchareb-Haouchine, Fatima Zohra, Abderrahmane Boudoukha, and Abdelhamid Haouchine, (2012).** "Hydrogéochimie et géothermométrie: apports à l'identification du réservoir thermal des sources de Hammam Righa, Algérie." Hydrological sciences journal 57.6: 1184-1195.
- **Boudoukha, Abderrahmane, and Malika Athamena, (2012).** "Caractérisation des eaux thermales de l'ensemble Sud sétifien. Est algérien." Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science 25.2 :103-118.
- **Boughrara, Hammam.** "Les sources Thermales en Algérie."
- **Bredberg, Katarina, et al, (2001).** "Anaerobic desulfurization of ground rubber with the thermophilic archaeon *Pyrococcusfurius*–a new method for rubber recycling." Applied microbiology and biotechnology 55.1 :43-48.

- **Bruins, Marieke E., Anja EM Janssen, and Remko M. Boom (2001).** "Thermozymes and their applications." *Applied biochemistry and biotechnology* 90.2:155-186.
- **Capdepuy, M., and J. Canellas (1995).**"La flore bactérienne des eaux thermales et minérales." *La Houille Blanche* 2-3 :70-72.
- **Coorevits, An, et al (2011).**"*Bacillus thermolactis* sp. nov., isolated from dairy farms, and emended description of *Bacillus thermoamylovorans*." *International journal of systematic and evolution ary microbiology* 61.8 :1954-1961.
- **Courtois, Anthony, et al (2014).** "Exo polysaccharides isolated from hydrothermal vent bacteria can modulate the complement system." *PloS one* 9.4 :e94965.
- **DEA, DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES, (2006).** CONTRIBUTION A LA CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE L'EAU THERMALE ET DES EAUX MINERALES DE BETAFO. Diss. UNIVERSITE D'ANTANANARIVO.
- **Dib, I. (2010).** L'IMPACT DE L'ACTIVITE AGRICOLE ET URBAINE SUR LA QUALITE DES EAUX SOUTERRAINES DE LA PLAINE DE GADAINA-AIN YAGHOUT (EST ALGERIEN (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).
- **Ellen, Albert F., et al (2019).**"The sulfolobacin genes of *Sulfolobus acidocaldarius* encode novel antimicrobial proteins." *Journal of bacteriology* 193.17 (2011): 4380-4387 et de pro drogue de nature phénolique ".
- **F. Hervan, (2019).** " La vie à haute température " [en ligne]. Disponible sur:<https://www.studocu.com/fr/document/universite-claude-bernard-lyon-1/ecophysiologie-vie-en-milieus-extremes/la-vie-a-haute-temperature/14662043>.
- **Garg, Neha, et al, (2012).** "Lantibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.14 :5241-5246.
- **Girard, H.** Techniques de microbiologie agricole. No. 576 G57. 1958.
- **Hayek, S.A., Gyawali, R.& Ibrahim, S.A.( 2013).**In: Méndez- Vilas, A. (ed.) *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*. Formatex Research Center.
- **Hayek, Saeed A., Rabin Gyawali, and Salam A. Ibrahim.**"Antimicrobial Natural Products."
- **HELLAL, Saadia, (2016).** Etude de la nature de l'eau de source de Ain Franine (Kristol, wilaya d'Oran) et son utilisation. Diss.
- **Irwin, Jane A., and Alan W. Baird, (2004).** "Extremophiles and their application to veterinary medicine." *Irish veterinary journal* 57.6: 1-7.

- **ISO 10566(1994).**Qualité de l'eau — Dosage de l'aluminium — Méthode par spectrométrie à l'aide du violet de pyrocatechol.
- **ISO 6058,(1984).**Qualité de l'eau — Dosage du calcium — Méthode titrimétrique à l'EDTA.
- **ISO 6333, (1986).**Water quality — Determination of manganese — Formaldoxime spectrometric method.
- **ISO 6777, (1984).**Qualité de l'eau — Dosage des nitrites — Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire.
- **ISO 6878, (2004).**Qualité de l'eau — Dosage du phosphore — Méthode spectrométrique au molybdate d'ammonium.
- **ISO 7027-1, (2016).**Water quality — Determination of turbidity — Part 1: Quantitative methods.
- **ISO 7150-2, (1986).**Qualité de l'eau — Dosage de l'ammonium — Partie 2: Méthode spectrométrique automatique.
- **ISO 7888(1985).** Qualité de l'eau — Détermination de la conductivité électrique
- **ISO 8467, (1993).**Qualité de l'eau — Détermination de l'indice de permanganate.
- **ISO 9964-1,(1993).**Qualité de l'eau — Dosage du sodium et du potassium — Partie 1: Dosage du sodium par spectrométrie d'absorption atomique.
- **ISO 9964-3, (1993).**Qualité de l'eau — Dosage du sodium et du potassium — Partie 3: Dosage du sodium et du potassium par spectrométrie d'émission de flamme.
- **Jean Guézennec, (2014).** Bactéries marines et biotechnologies. [En ligne] : <https://www.eyrolles.com/Sciences/Livre/bacteries-marines-et-biotechnologies-9782759221448/>
- **Kádár, Zsófia, et al, (2003).** "Hydrogen production from paper sludge hydrolysate." Biotechnology for Fuels and Chemicals. HumanaPress, Totowa, NJ. 557-566.
- **Karine Alain, Claire Geslin, Anne Godfroy, Daniel Prieur (2009).** " Les thermophiles":<https://studylibfr.com/doc/522852/les-thermophiles>
- **Keller, Nancy, (2011).** "The fungal treasure chest: Spore origins?." FungalBiologyReviews 25.1 :73-77.
- **Khelil, Nihel Klouche, et al, (2013).**"A novel halotolerant *bacterium* isolated from El Goléa Lake in Algeria and antimicrobial potential of this strain." Journal of Agricultural Science and Technology. A 3.10A: 825.
- **Kovács, László G., et al, (1995).**"Transcriptional organization and expression of noIXWBTUV, a locus that regulates cultivar specific nodulation of soybean by



Rhizobium fredii USDA257." Molecular microbiology 17.5 923-933

- **Madigan, M. T., and J. M. Martinko, (2007).**"Biologie des microorganismes. 11e éd. ed." :331-423.
- **Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker, (2000).** "Brockbiology of microorganisms, Pearson Education." Inc. USA. Halaman 144.172 :713.
- **Madigan, Michael T., John M. Martinko, and Jack Parker, (2006).** Brockbiology of microorganisms. Vol. 11. UpperSaddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.
- **Marinelli, Flavia, and Olga Genilloud, eds, (2013).** Antimicrobials: new and old molecules in the fight against multi-resistant bacteria. Springer Science & Business Media.
- **Mathis, B. J., et al, (2008).**"Electricity generation by thermophilic microorganisms from marine sediment." Applied microbiology and biotechnology 78.1 :147-155.
- **MEKEBRET.I, (2017).** Synthèse hydrogéologique et origine de la salinité des eaux thermo-minérales du littoral oranais par les méthodes géochimiques et isotopiques. Mémoire de magister en Sciences de la Terre. Faculté des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université d'Oran 2.156P.
- **NF T90-00, (2001).**Qualité de l'eau - Détermination du pH.
- **NF T90-003, (1984).**Essais des eaux - Détermination de la concentration totale en calcium et magnésium - Méthode titrimétrique à l'EDTA.
- **NF T90-012, (1975).**Essais des eaux - Dosage des nitrates .
- **NF T90-014, (1952).**Essais des eaux - Dosage des ions chlore
- **NF T90-031, (1977).**Essais des eaux. Détermination de la résistivité ou de la conductivité électrique.
- **NF T90-033, (1975).**Essais des eaux - Mesure de l'indice de diffusion dite mesure de turbidité.
- **NF T90-036, (1977).**Essais des eaux - Détermination de l'alcalinité (titre alcalimétrique et titre alcalimétrique complet.
- **Novotny Jr, JAMES F., and JEROME J. Perry, (1992).** "Characterization of bacteriocins from two strains of Bacillus thermoleovorans, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species." Applied and Environmental Microbiology 58.8 :2393-2396.
- **Octarya, Zona, Titania Tjandrawati Nugroho, and Yuana Nurulita, (2022).** "Molecular Identification, GC-MS Analysis of Bioactive Compounds and Antimicrobial Activity of Thermophilic Bacteria Derived from West Sumatra Hot-Spring Indonesia." HAYATI Journal of Biosciences 29.4 :549-561.

- **Ouali, S., et al, (2018).** "Cartographie et caractérisation des ressources géothermiques de l'Algérie." *Journal of Renewable Energies* 21.1 :54-61.
- **Ouali, Salima, (2018).** "Elements of the Geothermal Atlas of Algeria." CDRE, April.
- **Pace, Norman R, (1997).** "A molecular view of microbial diversity and the biosphere." *Science* 276.5313:734-740.
- **Pécastaings, Sophie, (2010).** Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionellapneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Diss. Toulouse 3.
- **Pikuta, Elena V., Richard B. Hoover, and Jane Tang, (2007).** "Microbial extremophiles at the limits of life." *Critical reviews in microbiology* 33.3 :183-209.
- **Popoff, Georges, (2010).** "Spécificité, législation et contrôle des eaux minérales naturelles utilisées dans les établissements thermaux français." *PressTherm Climat* 147.2 :93-106.
- **Postec, Anne, et al, (2005).** "Optimisation of growth conditions for continuous culture of the hyper thermophilic archaeon *Thermococcus hydrothermalis* and development of sulphur-free defined and minimal media." *Research in Microbiology* 156.1 :82-87.
- **Pranckuté, Raminta, et al, (2015).** "Differences of anti bacterial activity spectra and properties of bacteriocins, produced by *Geobacillus* sp. Bacteria isolated from different environments." *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences* 5.2: 155-161.
- **Préparer la Gélose Nutritive MAST® (DM179D).pdf.**
- **Prescott, L. M., et al, (2003).** "Microbiologie (De Boeck Université)." *Applied Clay Science* 38 :97-103.
- **Prescott, L. M., J. P. Harley, and D. A. Klein, (2003).**"La chimiothérapie antimicrobienne." *Microbiologie* 2: 806-811.
- **Prieto-Barajas, Cristina M., et al, (2017).** "Effect of seasonality and physico chemical parameters on bacterial communities in two hot spring microbial mats from Araró, Mexico." *Revista mexicana de biodiversidad* 88.3 :616-624.
- **Rasuk, Maria Cecilia, et al, (2016).** "The diversity of microbial extremophiles." *Molecular diversity of environmental prokaryotes* : 87-126.
- **Rodier, Jean, ChGeoffray, and L. Rodi, (1984).** "L'analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer: chimie, physico-chimie, bactériologie, biologie." :1343-1352.
- **Rodier, Jean, et al, (2005).** "Water Analysis: Natural Waters, Wastewaters, Sea Water." Ed. Dunod, Paris 1384.

- **Saghatelyan, Ani, et al, (2021).** "Microbial diversity of terrestrial geo thermal springs in Armenia and Nagorno-Karabakh: a review." *Microorganisms* 9.7: 1473.
- **Sanders, Laure, (2006).** "Les eaux thermales en traitement adjuvant dermatologique et dermo-cosmétique—exemple de l'Eau thermale d'Avene." Université Joseph Fourier faculté de pharmacie de Grenoble, La Tronche, France.
- **Santos, Helena, and Milton S. Da Costa, (2002).** "Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments." *Environmental Microbiology* 4.9 :501-509.
- **Santos, Helena, et al, (2011).** "Organic compatible solutes of prokaryotes that thrive in hot environments: the importance of ionic compounds for thermostabilization." *Extremophiles handbook*.
- **Shafia, Fred, (1966).** "Thermocins of *Bacillus stearothermophilus*." *Journal of Bacteriology* 92.2 :524-525.
- **Shakhatreh, Muhamad Ali K., et al, (2017).** "Microbiological analysis, antimicrobial activity, and heavy-metals content of Jordanian Ma'in hot-springs water." *Journal of infection and public health* 10.6 :789-793.
- **Shamsuzzaman, Abad Ali, et al, (2014).** "Green Synthesis of ZnO nano particles Using *Bacillus Subilis* And Their Catalytic Performance In The One-Pot Synthesis of Steroidal Thiophenes." *European Chemical Bulletin* 3.9: 939-945.
- **Sharma, Rohit, et al, (2013).** "Biocatalysis through thermostable lipases: adding flavor to chemistry." *Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology*. Springer, Dordrecht. 905-927.
- **Sharma, Sunny, et al, (2019).** "Thermostable enzymes for industrial biotechnology." *advances in enzyme technology*. Elsevier. 469-495.
- **SO 22743, (2006).** Qualité de l'eau — Dosage des sulfates — Méthode par analyse en flux continu (CFA).
- **TC\_300-Nutritif-bouillon\_FR\_230215.pdf**
- **Tiwari, Brijesh K., et al, (2009).** "Application of natural antimicrobials for food preservation." *Journal of agricultural and food chemistry* 57.14: 5987-6000.
- **Verma, Jay Prakash, et al, (2018).** "Characterization and screening of thermophilic *Bacillus* strains for developing plant growth promoting consortium from hot spring of Leh and Ladakh region of India." *Frontiers in microbiology* 9: 1293.
- **Vezina, L., and M. Lacroix, (2000).** "Tests biochimiques classiques pour l'identification des *Pectobacterium*(*Erwiniapectinolytiques*) et des *Pseudomonas fluorescents*." : 2-6.

- **Wahiba et Ibn al-Sheikh, (2013).** Etude de la qualité physico-chimique et microbiologique des eaux thermales de Hammam El-Charef, Hammam Zelfana et l'eau minérale de Zamzam ainsi que leur activité antibactérienne et anti-oxalocalcique. Insulter. Université de Djelfa.
- **Weiss, Joshua L., et al, (2004).** "Obesity, obstetric complications and cesarean delivery rate—a population-based screening study." American journal of obstetrics and gynecology 190.4: 1091-1097.
- **Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977).** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc Natl Acad Sci USA 74, 5088-5090
- **Woese, C. R., et a, (1991).** "Archaeal phylogeny: reexamination of the phylogenetic position of *Archaeoglobus fulgidus* in light of certain composition-induced artifacts." Systematic and Applied Microbiology 14.4: 364-371.
- **Woese, Carl R., Otto Kandler, and Mark L. Wheelis, (1990).** "Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya." Proceedings of the National Academy of Sciences 87.12: 4576-4579.
- **Yakhlef, Wahiba, and Abdelhak Darbouche, (2012).** "Metabolic diversity of thermophilic bacteria from hot springs in Algeria." J. Acad 2.1: 57-65.
- **Zerizer, H., et al, (2006).** "IDENTIFICATION D'UNE ACTINOMYCETALE, PRODUCTRICE D'ANTIBACTERIENS, ISOLEE DE SOLS ARIDES DE LA REGION DE BISKRA." Sciences & Technologie. C, Biotechnologies: 17-22.

# ***ANNEXES***

**Annexes I****1. Matériels pour les analyses physico-chimiques :****1. Matériels pour échantillonnage :**

- Bouteille en verre de 1 litre.
- Glacière

**2. Appareillage :**

- Spectrophotomètre UV -VISIBLE.
- Multi-paramètre (HQ 40d).
- Balance analytique.
- Autoclave.
- Turbidimètre HACH 2100N.
- Plaque chauffante.
- Thermomètre numérique.
- Photomètre a flamme Dr. LANGE (JENWAY).
- L'hôte.

**3. Appareillage :**

- Fiole 100ml -50ml.
- Erlenmeyer.
- Bécher.
- Pipette graduée.
- Eprouvette.
- Burette
- Flacons en verre.
- Spatule.

**4. Les réactifs :****\* Calcium/Magnésium:****• Solution d'E.D.T.A N/50 (C10 H14 N2 Na2 O8 2H2O) : (0,02N ou 0,01M) :**

- EDTA 3, 725 g. après déshydratation à 80°C pendant 2 h.
- H2O distillée q.s.p 1000 ml.

**• Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 2 N :**

- NaOH (pastilles) 80 g.
- H2O distillée q.s.p 1000 ml.

**•Solution d'hydroxyde d'ammonium (NH<sub>4</sub>OH) pH = 10,1:**

→ Chlorure d'ammonium 67,5 g.

→ NH<sub>4</sub>OH (25%) 570 ml.

→ HCl concentré.

→ H<sub>2</sub>O distillée q.s.p 1000.

**\* Chlorure:****• Solution de nitrate d'argent à 0,01 N:**

→ 1,6987 d'AgNO<sub>3</sub> 1000 ml d'eau distillée.

**• Indicateur coloré K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> à 10 %:**

→ 10 g de K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> Q.S.P 100 ml d'H<sub>2</sub>O distillée.

**\* Sulfate:****• Solution stabilisant :**

→ Acide chlorhydrique (c) 60 ml.

→ Ethanol 200 ml.

→ Chlorure de sodium 50 g.

→ Glycérol 100 ml.

→ Eau distillée Q.S.P. 1000 ml.

**• Solution de chlorure de baryum :**

→ Chlorure de baryum 150 g.

→ Acide chlorhydrique 5 ml.

→ Eau distillée Q.S.P. 1000 ml.

**\* L'alcalinité (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>):****• Solution d'HCl à 0,1 N :**

→ d'HCl à 1 N 100 ml.

→ H<sub>2</sub>O distillée q.s.p 1000ml.

**\* Nitrate:**

• **Solution de salicylate de sodium à 0.5 % (renouveler toutes les 24 h. ).**

→ 0.5 Gr de salicylate de sodium dans 100 ml d'eau distillée.

• **Solution d'hydroxyde de sodium à 30 %.**

→ 30 gr de NaOH dans 100 ml d'eau distillée.

• **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré.**

• **Tartrate double de sodium et de potassium.**

→ Hydroxyde de sodium NaOH 400g

→ Tartrate de sodium et de potassium 60g.

→ Eau distillée Qsp 1000 ml.

Laisser refroidir avant de compléter à 1000 cc

Cette solution doit être conservée dans un flacon de polyéthylène.

**\* Nitrite:**

• **Réactif mixte :**

→ Sulfanilamide 40 g.

→ Acide phosphorique 100 ml.

→ N-1- Naphtyle éthylène diamine 2 g.

→ H<sub>2</sub>O distillée q.s.p 1000 ml.

**\* l'ammonium:**

• **Réactif I :**

→ Acide dichloroisocyanurique 2 g.

→ Hydroxyde de sodium ( NaOH ) 32 g.

→ H<sub>2</sub>O distillée q.s.p 1000 ml.



**• Réactif II coloré :**

- Tri citrate de sodium 130 g.
- Salicylate de sodium 130 g.
- Nitropruciate de sodium 0.97 g.
- H<sub>2</sub>O distillée q.s.p 1000 ml.

**\* Phosphate:****• Réactif mixte :**

- Heptamolybdate d'ammonium 13 g.
- Eau distillée 100 ml.
- Tartrate d'antimoine 0.35 g.
- Eau distillée 100 ml.
- Acide sulfurique pur . 150 ml
- Eau distillée 150 ml.

**• Acide ascorbique :**

- Acide ascorbique 10 g.
- Eau distillée 100 ml.

**\* Matière organique :****• Solution de permanganate de potassium à 0.01 N :**

- Solution de KMnO<sub>4</sub> à 0.1 N 100 ml.
- H<sub>2</sub>O distillée q.s.p 1000 ml.

**• Solution d'acide oxalique à 0.01 N :**

- C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub> à 0.1N 100 ml.
- H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> concentré 50 ml.
- H<sub>2</sub>O distillée q.s.p 1000 ml.

**• Solution d'acide sulfurique diluée (d=1.27) :**

- H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> (d=1.84) 1 volume.

→ H<sub>2</sub>O distillée 3 volumes.

**\* Fer:**

**• Tampon acétate.**

→ Acétate d'ammonium 40g.

→ Acide acétique cristallisable 50ml.

→ Q.S.P 100 ml d'eau distillée.

**• Chlorhydrate d'hydroxylamine a 10%.**

→ Chlorhydrate d'hydroxylamine 10g

→ Q.S.P 100 ml d'eau distillée.

→ Cette solution est stable pendant une semaine.

**• Solution de phénanthroline -1,10.**

→ Dissoudre 0,42 g de Phénanthroline-1.10 monohydraté (C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O) dans 100ml d'eau distillée contenant 2 gouttes d'Acide chlorhydrique.

→ Cette solution est stable pendant une semaine. Conserver dans un flacon teinté et au réfrigérateur.

*Annexes 2***2. Préparation des milieux de cultures :****2.1. Préparation du bouillon nutritif :****Tableau 10:**Composition de bouillon nutritif.

Bouillon nutritif	
Ingrédients	gramme/litre
Peptones	10 g
Extrait de boeuf	1 g
Extrait de levure	2g
Chlorure de sodium	5g
pH final	6.8 ± 0.2 at 25°C

Suivre les recommandations du fabricant :

- Ajouter 13g à 15g de bouillon nutritif en poudre dans 1L d'eau distillée.
- Mélanger et dissoudre complètement.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.(**TC\_300-Nutritif-bouillon\_FR\_230215.pdf**).

2.2. Préparation de gélose nutritive :**Tableau 11** : Composition de gélose nutritive.

<b>Composants:</b>	<b>Concentration :</b>
Peptone	6,0 g/litre
Extrait de bœuf	1,0 g/litre
Extrait de levure	2,0 g/litre
Chlorure de sodium	5,0 g/litre
Agar	14,0 g/litre
<b>pH final: 7,3 ± 0,2</b>	

Suivre les recommandations du fabricant :

1. Se référer à l'étiquette de la boîte pour les volumes et quantités nécessaires. Préparer la Gélose NutritiveMAST® (DM179D) en dissolvant la poudre dans de l'eau distillée. Pour les sachets de milieu, dissoudre tout le contenu du sachet dans le volume d'eau inscrit sur l'étiquette.
2. Autoclave à 121C pendant 15 minutes.
3. Refroidir à 50 à 55C puis maintenir à cette température dans un bain marie. Ajouter 5 à 7% de sang de mouton ou de cheval dé fibrine et stérile. Les géloses au sang cuit (gélose chocolat) peuvent aussi être préparées. D'autres suppléments de croissance peuvent être utilisés.
4. Si nécessaire, le milieu peut devenir sélectif par ajout de divers suppléments sélectifs.
5. Couler le milieu en boîte de Pétri (15 à 20 ml par boîte) et laisser reposer.
6. Les boîtes préparées peuvent être utilisées immédiatement ou stockées dans des sacs en plastique à 2 à 8C pendant une semaine au plus.
7. Ensemencer la boîte par épuisement pour obtenir des colonies isolées.

8. Incuber les boîtes en aérobie pendant 18 à 24 heures et en anaérobie pendant 72 heures au plus à 35 à 37°C (ou à d'autres températures selon la méthode suivie). **(Préparer la Gélose Nutritive MAST® (DM179D)).**

**3. Matériels pour les analyses microbiologiques :**

**3.1. Matériels pour échantillonnage :**

- Bouteille en verre de 500ml.
- Glacière.

**3.2. Appareillages :**

- Bec-benzène.
- Bain marie.
- Etuve à 55°C.
- Réfrigérateur.
- Autoclave.

**3.3. Matériels :**

- Les boîtes de pétrie.
- Pipettes pasteur stérile.
- Pince.
- Tube à essai stérile.
- Portoir.
- Pipettes.
- L'écouvillon..
- Galerie api 20E.
- L'huile d'immersion.

**4. Réactifs :**

- Violet de gentiane.
- Lugol.
- L'alcool.
- Fuchsine.
- Kovacs.
- TDA.
- VP1 et VP2.

## Annexes 3

**5. Résultats physiques et chimiques :****Tableau 12** : résultat physique et chimique des eaux thermales du Sud Sétifien. (Boudoukha, Abderrahmane, et Malika Athamena ,2012)

Point d'eau	Cd <sup>2+</sup> (µg.L <sup>-1</sup> )	Ni <sup>2+</sup> (µg.L <sup>-1</sup> )	Ba <sup>2+</sup> (µg.L <sup>-1</sup> )	Al <sup>3+</sup> (µg.L <sup>-1</sup> )	Pb <sup>2+</sup> (µg.L <sup>-1</sup> )	Li <sup>+</sup> (µg.L <sup>-1</sup> )	Sr <sup>2+</sup> (µg.L <sup>-1</sup> )	Fe (µg.L <sup>-1</sup> )
Source	20	42	56	1 530	230	380	3 600	350

**Tableau 13**: Résultats de la composition minérale des échantillons d'eau analysés physique et chimique des eaux thermales de Hammam Righa et Hammam Melouane. (Bouacem et Khelifa Diss, 2019).

Eaux	Eléments (mg/L)										
	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	K <sup>+</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Hammam Righa	320	30,6	200	333	14	280,7	670	0,03	0,01	1,52	0,58
Hammam Melouane	832,5	90,8	1122	1500	145,3	325	900	0,01	0,1	0,2	0,4

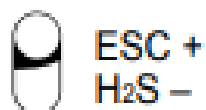
**Tableau 14** : Résultats des paramètres chimiques des eaux minérales naturelles (Hammam El-Charef et Zelfana, eau de Zamzam). (Wahiba et Ibn al-Sheikh Université de Djelfa, 2013).

Paramètres chimiques	El-Charef	Zelfana	Zamzam
Couleur	Abs.	Abs.	Abs.
Température	45,1-46,4	45-45,2	/
pH	6,9	6,5	7,6
Turbidité	0,8	0,4	0,1
Conductivité	2750	2770	1014
Minéralisation	2085,996	2101,167	769,163
Taux des solides dissouts	1374	1383	507
Salinité	1,4	1,4	0,5
Résidu Sec	910	947	863

6. Lecture de galerie API 20E :**Tableau 15:** Tableau de lecture de galerie API 20E.

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
IND	L-tryptophane	0,98	formation d'INDole	XYL - mélanger / 2-3 min + EHR / 5 min	
URE	urée	0,648	UREase	jaune	rouge
GLU MAN LAC	D-glucose D-mannitol D-lactose (origine bovine)	1,96 1,96 1,96	acidification (GLUcose) acidification (MANnitol) acidification (LACtose)	BCP	
SAC MAL SAL XYL ARA	D-saccharose D-maltose salicine D-xylose L-arabinose	1,86 1,96 1,64 1,64 1,64	acidification (SACcharose) acidification (MALtose) acidification (SALicine) acidification (XYLose) acidification (ARABinose)	pourpre	jaune / vert-jaune
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment (1)	diffusion du pigment noir (1)
ESC	esculine citrate de fer	0,36 0,11	hydrolyse ( $\beta$ -glucosidase) (ESCuline)	jaune (2)	brun-noir (2)
GLY CEL MNE MLZ RAF SOR RHA TRE	glycérol D-cellobiose D-mannose D-mélezitose D-raffinose D-sorbitol L-rhamnose D-tréhalose	1,82 1,86 1,96 1,96 2,18 2,18 1,96 1,96	acidification (GLYcérol) acidification (CELlobiose) acidification (ManNosE) acidification (MÉLÉZitose) acidification (RAFfinose) acidification (SORbitol) acidification (RHAmmose) acidification (TREhalose)	BCP	
CAT		-	CATALase	Après 30 min à l'air libre H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans un tube positif	
SPOR		-	spores	absence	présence
GRAM		-	coloration de Gram	rose	violet
COCC		-	morphologie	bacille	coque

- (1) En incubation en jarre ronde, le pigment diffuse seulement dans la partie inférieure du tube.
- (2) La coloration brun-noir se développe parfois seulement à l'air libre : en tenir compte pour la lecture. La coloration noire peut être due à la formation de FeS, l'H<sub>2</sub>S réagissant avec le citrate de fer. Une production faible est limitée à la partie inférieure du tube ; une production importante oblige à recourir à la lecture en lumière UV.



ESC +  
H<sub>2</sub>S -



ESC - / +  
H<sub>2</sub>S - / +



ESC -  
H<sub>2</sub>S +

- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale, notamment des peptones. ATCC est une marque utilisée, déposée et/ou enregistrée appartenant à American Type Culture Collection. (**Galerie api 20e07882-G - FR - 2006/02**).

### 7. Résultats de la galerie API 20E :

**Tableau 16:** Résultats de la galerie API 20E de l'eau thermale Hamam Righa

	<b>E1C3</b>	<b>E2C1</b>	<b>E3C1</b>	<b>E1C1</b>
<b>ONPG</b>	-	-	-	-
<b>ADH</b>	-	-	-	-
<b>LDC</b>	-	-	-	-
<b>ODC</b>	-	-	-	-
<b>CIT</b>	-	-	-	-
<b>H2S</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>	-	-	-	-