

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض
Faculté Des Sciences de la Nature et de
la Vie et des Sciences de la Terre
Département : Biologie



جامعة الجبالي بونعاما - خميس مليانة
Université Djilali Bounaama
Khemis Miliana
قسم : البيولوجيا

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie microbienne

THEME

Evaluation de l'activité hydrolytique des bactéries thermophiles isolés de la source
hydrothermale de Hammam Righa

Réalisé par :

SADOUKI Ikram

MAHAMMEDI Fatima Zahra

Soutenu le 02/07/2024 devant le jury composé de :

| | | | |
|----------------------|------------------|-----|-------------------|
| Présidente | Mme KOCHRANE R | MAB | U. Khemis Miliana |
| Promotrice | Mme ITATATHINE A | MAB | U. Khemis Miliana |
| Co-promotrice | Mme TOUAHIR N | MAB | U. Khemis Miliana |
| Examineur | Mr BELABED B | MAA | U. Khemis Miliana |

Année universitaire : 2023/2024

Remerciement

Nous remercions Allah, le tout puissant pour sa bonté, pour sa miséricorde et pour sa clémence. Et de nous avoir donné la force et la volonté d'entamer et de terminer ce travail. Tout d'abord, Nous remercions plus particulièrement madame ITATAHINE Amina d'avoir accepté la responsabilité de Directeur de mémoire et de nous avoir permis de mener à bien ce travail grâce à son soutien de tous les instants, sa générosité, ses conseils et sa bienveillance. Nous avons vraiment eu un grand honneur de travailler sous sa direction. Nous adressons nos remerciements aux membres de jury merci de nous avoir fait l'honneur d'accepter de juger notre mémoire de Master, veuillez trouver ici l'expression de notre grand respect et nos vifs remerciements. Nous adressons également un immense merci à toute la famille du département de biologie en particulier à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à notre formation enseignants, collaborateurs ou simples agents. Nous n'oublions pas de remercier toute notre promotion du Master 2 biotechnologie microbienne 2024, avec qui on a passé des moments difficiles et d'autre agréable grâce à leur sympathie et esprit d'équipe. Nous remercions aussi nos parents, nos amis d'études et toutes personnes ayant soutenu de près ou de loin ce travail.

Dédicaces

Je tiens c'est avec grand plaisir que je dédie ce modeste travail :

*Ma mère qui m'a entouré d'amour, d'affection et qui fait tout pour ma réussite,
que dieu la garde.*

*Mon père qui m'a aidé à devenir ce que je suis aujourd'hui, que dieu le garde
et le protège et lui donne la santé.*

*A mes chers frères Younes , Amine pour leurs encouragements permanents,
et leur soutien moral.*

*A ceux avec qui j'ai vécu les plus beaux moments de mes années à l'université,
à mes compagnes et amis Sarah, IBtisseem , Fatima zahra et Assia.*

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours
universitaire.*

A tous ceux qui comptent pour moi.

A vous chers lecteur

Ikram.

Dédicaces

Je tiens c'est avec grand plaisir que je dédie ce modeste travail :

*Ma mère qui m'a entouré d'amour, d'affection et qui fait tout pour ma réussite,
que dieu la Garde.*

*Mon père qui m'a aidé à devenir ce que je suis aujourd'hui, que dieu le garde
et le protège et Lui donne la santé.*

À ma très chers sœur kawthar.

À Mes très chers frères Amine, Younes et Idris.

A mes collègues Amira, souad et ikram.

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours
universitaire.*

A tous ceux qui comptent pour moi.

Á ma promo de master 2 en biotechnologie microbienne et mes enseignants.

Fatima Zahra

Résumé

L'objectif de cette étude est d'identifier et d'isoler les bactéries thermophiles qui génèrent des thermozymes de source hydrothermale de Hammam Righa de la wilaya de Ain defla .

Nous avons isolé les souches thermophiles à partir d'échantillons d'eau prélevés dans deux forages distincts de Hammam Righa .la purification des souches On a utilisé deux milieux de culture (GN et GN a base de l'eau de source.) Identification des souches en se basant sur leurs caractéristiques culturelles et morphologiques, et sur leur biochimie. Et l'activité hydrolytique On a réalisé une analyse des activités amylolytiques, protéolytiques et lipolytiques. On a pu identifier la présence de ces activités en utilisant des substrats tels que l'amidon, la caséine, la lécithine, le tween 80 et l'huile d'olive.

La caractérisation phénotypiques des souches isolées à base de leurs propriétés macroscopiques, microscopiques et biochimiques nous a permis d'isoler 17 souches .L'évaluation de l'activité enzymatique des souches isolées a permis de trouver 13 souche amylase positif, 11 de souches Caseinase positif,6de souches estérase (T80) positif et 2 de souches est lécithines positif .D'après nos résultats, nous avons remarqué que nos souches possèdent un bagage enzymatique très développé, la souche S18 est capable d'hydrolysé la majorité des substrats utiliser, donc on peut dire qu'elle possède une activité amylolytique protéolytique et lipolytique.

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

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

Abstract

The objective of this study is to identify and isolate the thermophilic bacteria which generate thermozyms from the hydrothermal source of Hammam Righa in the wilaya of Ain defla .

We isolated thermophilic strains from water samples taken from two separate boreholes in Hammam Righa. The purification of the strains We used two culture media (GN and GN based on spring water.) Identification of strains based on their cultural and morphological characteristics, and their biochemistry. And the hydrolytic activity An analysis of the amylolytic, proteolytic and lipolytic activities was carried out. The presence of these activities could be identified using substrates such as starch, casein, lecithin, tween 80 and olive oil.

The phenotypic characterization of the isolated strains based on their macroscopic, microscopic and biochemical properties allowed us to isolate 17 strains. The evaluation of the enzymatic activity of the isolated strains made it possible to find 13 amylase positive strains, 11 Caseinase positive strains. , 6 strains are esterase (T80) positive and 2 strains are lecithin positive. According to our results, we noticed that our strains have a very developed enzymatic background, the S18 strain is capable of hydrolyzing the majority of the substrates used, therefore we can say that it has amylolytic, proteolytic and lipolytic activity.

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

Key words: thermophiles, geothermal, thermozyms, Screening, hydrolytic activities.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد وعزل البكتيريا المحبة للحرارة التي تولد الإنزيمات الحرارية من المصدر الحراري المائي لحمام ريغة بوالية عين الدفلى.

عزلنا السالالت المحبة للحرارة من عينات المياه المأخوذة من بئرين منفصلين في حمام الرقة. تنقية السالالت استخدمنا وسطين استزراعين (GN و GN يعتمدان على مياه الينابيع) (تحديد السالالت على أساس خصائصها الاستزراعية والمورفولوجية. والكيمياء الحيوية الخاصة بهم. والنشاط المائي تم إجراء تحليل لأنشطة التحللية والبروتينية والتحلل الدهني. ويمكن تحديد وجود هذه الأنشطة باستخدام ركائز مثل النشا، الكازين، الليسيثين، توين 80 وزيت الزيتون.

إن التوصيف المظهري للسالالت المعزولة بناءً على خواصها العيانية والمجهرية والكيميائية الحيوية سمح لنا بعزل 17 ساللة موجبة، وقد مكنتنا تقييم النشاط الأنزيمي للسالالت المعزولة من العثور على 13 ساللة موجبة لأميليز، و 11 ساللة موجبة للكازينيز سالالت استريز (T80) إيجابية وساللتان إيجابيتان للليسيثين. وفقاً لنتائجنا، الحظنا أن سالالتنا لديها خلفية إنزيمية متطورة للغاية، وساللة S18 قادرة على التحلل المائي لغالبية الركائز المستخدمة، لذلك يمكننا القول ذلك. له نشاط محلل لألميلوليتيك ومحلل للبروتين ومحلل للدهون.

لقد أتاح فحص أنشطة التحلل المائي العثور على عدة أنواع من الهيدروليزات ذات الإمكانيات الجيدة للتطبيق الصناعي.

الكلمات المفتاحية: محبة للحرارة، الطاقة الحرارية الأرضية، الإنزيمات الحرارية، الفحص، الأنشطة التحلل المائي.

Table de matiere

| | |
|--|----|
| Introduction | 15 |
| SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE | 4 |
| I Chapitre I. Le monde extrêmophile | 4 |
| I.1. Les microorganismes extrêmophiles : | 4 |
| I.2. La diversité des extrêmophiles | 5 |
| I.2.1. Les microorganismes extrêmophiles et la température | 5 |
| I.2.2. Microorganismes alcalophiles et acidophiles : | 6 |
| I.2.2.1. Microorganismes acidophiles | 6 |
| I.2.2.2. Microorganismes alcalophiles | 6 |
| I.2.3. Microorganismes halophiles | 7 |
| I.3. Intérêt des extrêmophiles | 8 |
| I.4. Les bactéries thermophiles | 8 |
| I.4.1. Définition des thermophiles | 8 |
| I.4.2. Diversité (Phylogénie) des thermophiles | 9 |
| I.4.2.1-Bactéries | 9 |
| I.4.2.2 -Archaea | 9 |
| I.4.2.3 -Eucarya | 10 |
| I.4.3 Les principales bactéries thermophiles | 10 |
| I.4.4 Besoins nutritifs des bactéries thermophiles | 10 |
| I.4.5 Les niches écologiques | 11 |
| I.4.5.1 Biotopes naturels | 11 |
| I.4.5.1.1 Biotopes marins | 11 |
| I.4.5.1.2 Biotopes terrestres : | 12 |
| I.4.5.2 Biotopes artificiels : | 13 |
| I.5. Écosystèmes à chaleur : | 13 |
| I.5.1. Les sources thermiques | 13 |
| I.5.1.1. Les sources thermales de l'océan.: | 13 |
| I.5.1.2. Les sources thermales de la Terre : | 13 |
| I.5.2.1. Présentation de la source thermale de Hammam Righa : | 15 |
| II. Chapitre II : Application biotechnologique des bactéries thermophiles | 16 |
| II.1. Les thermo enzymes : | 16 |
| II.1.1. Amylases : | 16 |
| II.1.2. La cellulase : | 17 |
| II.1.3. Lipases | 17 |
| II.1.4. Chitinase : | 18 |
| II.1.5. Protéase : | 18 |
| II.1.6. Les xylanases : | 19 |
| II.2. Application biotechnologique | 19 |
| II.2.1. Applications basées sur les biomolécules | 19 |

| | |
|---|-----------|
| II.2.1.1. Les enzymes..... | 19 |
| II.2.1.2 Applications basées sur cellules entières : | 21 |
| MATERIEL ET METHODES | 23 |
| I. Matériels | 23 |
| I.1. Verrerie..... | 23 |
| I.2. Appareillage..... | 23 |
| I.3. Milieux culture | 23 |
| I.4. Autres produits consommables..... | 23 |
| I.5. Autres matériels : | 23 |
| II. Méthodes | 23 |
| II.1. Protocol d'échantillonnage | 23 |
| II.2. Paramètres physico-chimiques..... | 24 |
| II.3- Analyses microbiologiques | 25 |
| II.3.1 Enrichissement, isolement et purification des isolats | 25 |
| II.3.2. Identification des isolats | 26 |
| II.3.2.1.- Caractérisation culturelle et morphologique..... | 26 |
| II.3.2.2. Caractérisation biochimique | 26 |
| II.3.2.2.1 Mise en évidence des enzymes respiratoires..... | 26 |
| II.3.2.2.3. Le système api20 E | 27 |
| II.3.3. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires | 27 |
| II.3.3.1 Détermination de l'Activité Amylolytique | 27 |
| II.3.3.2 Détermination de l'activité lipolytique | 28 |
| II.3.3.3- Détermination de l'activité protéolytique | 28 |
| Résultats Et Discussion | 30 |
| I. Profil physico-chimiques des sources thermales..... | 30 |
| II. Profils microbiologiques..... | 30 |
| II.1. Diversité des souches bactériennes..... | 30 |
| II.2 Identification des isolats..... | 31 |
| II.2.1 Détermination des caractères cultureux et morphologiques | 31 |
| II.2.1.1 Aspect macroscopique..... | 32 |
| II.2.1.2 Aspect microscopique..... | 33 |
| II.2.2 Caractérisation biochimique des isolats | 35 |
| II.2.2.1 Mise en évidence des enzymes respiratoires..... | 35 |
| II.2.2.3 Galerie Api 20 E..... | 37 |
| II.2.3 Profils de l'activité hydrolytique extracellulaire | 38 |
| Conclusion Et Perspectives | 43 |
| Références Bibliographiques | 45 |
| Annexes..... | 57 |

Liste des abréviations

A : Adénine
ADH : Arginine Dihydrolase
ADN : Acide Désoxyribonucléique
API : Analytical Profile Index
Arg : Arginine
Asn : Asparagine
ATP : Adénosine Triphosphate
BN : Bouillon Nutritive
BNhr : Bouillon Nutritive a base de l'eau de source
C : Cytosine **CIT** : Citrate **Cys** : Cystéine **G** : Guanine
GEL : Gélatine
Gln : Glutamine
GN : Gélose nutritive
GNhr : Gélose nutritif + eau de sources
IND : Indole
LDC : Lysine Décarboxylase
Lys : Lysine
Met : Methionine
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
ODC : Ornithine Décarboxylase
OGT : Température de croissance optimale modérée
PCR : Polymérase Chain Réaction
PH : potentiel d'hydrogène
T : Thiamine
TDA : Tryptophane Désaminase
Tyr : Tyrosine **U** : Uracile **URE** : Uréase
VP : Vogues Proskauer

Liste des Tableau

| Titre | Page |
|---|-----------|
| Tableau 1 : Microorganismes extrêmophiles et leurs environnements Adapté (Horikoshi et Bull, 2011). | 04 |
| Tableau 2 : Localisations et températures de quelques sources thermales algériennes | 15 |
| Tableau 3. Paramètres physico-chimiques de source thermale étudiée | 30 |
| Tableau 4 : Nombre des souches isolées dans deux milieux de culture | 30 |

Liste des figures

| Titre | Page |
|--|-----------|
| Figure 1 : Effet de la température sur les taux de croissance de microorganismes : psychrophiles, mésophiles, thermophiles, hyperthermophiles et hyperthermophiles extrêmes (Madigan et Martinko, 2007). | 06 |
| Figure 2 : Terminologie des extrémophiles en fonction de la température (axe des X) et du pH (axe des Y) (Quérellou et Guézennec, 2010). | 07 |
| Figure 3 : Eruption d'un geyser dans le parc national de Yellowstone, Wyoming, USA (Patrick, 2007) | 09 |
| Figure 4: Arbre phylogenetique universel | 10 |
| Figure 5 : fumeurs noirs, dorsale pacifique (Minic et <i>al.</i> , 2006). | 12 |
| Figure 6 : Sources hydrothermales de Hammam Righa. | 24 |
| Figure 7 : la mesure des paramètres physico-chimiques par multi paramètre | 24 |
| Figure 8: Enrichissement sur bouillon nutritif | 25 |
| Figure 9.- présentation graphique de la répartition spatiale des souches isolées dans milieu de culture (GN, GNhr) | 31 |
| Figure 10- Diagrammes en secteurs présentent l'aspect macroscopique des souches (L : lisse ; R : rugueux). | 32 |
| Figure11 : Aspect macroscopique de souches isolées cultivés sur différent milieux., A : souche 3 type rugueuse jaunâtre, souche 4 type lisse translucide , B : souche 16,16'type lisse translucide . | 33 |
| Figure 12- Diagrammes en secteurs présentent les formes cellulaires des souches | 34 |
| Figure 13- Observation au microscope photonique et à l'immersion (10x100) S1 : bacille filamenteuse Gram +, S2 : bacille Gram + , S6' :, S17 : filamenteuse Gram - | 34 |
| Figure 14- représentation graphique des souches selon le enzymes respiratoire (Ox : Oxydase). | 35 |
| Figure 15.- représentation graphique des souches selon le enzymes respiratoire (Cat : catalase). | 35 |
| Figure16. Diagrammes en secteurs présentent la fermentation du mannitol par les souches | 36 |

| | |
|---|-----------|
| Figure 17- Diagrammes en secteurs présentent la mobilité des souches | 36 |
| Figure18 : Test Mannitol-Mobilité , A : souche S8 Mannitol + immobile , B: souche S16' Mannitol + mobile | 37 |
| Figure19 : histogramme représente la fermentation des sucres par les isolats | 38 |
| Figure20 : résultats de l'identification biochimiques avec la galerie des Api 20 ^E | 38 |
| Figure 21.- Répartition des souches étudiées par type et fréquence de production des hydrolases extracellulaires. | 39 |
| Figure 22 : Exemple d'activités hydrolytiques détectées, A : hydrolyse de par la souche 15 , B : hydrolyse de l'amidon , C : hydrolyse de Tween80 par la souche 7, D : hydrolyse de la caséine par la souche 18 , E ; hydrolyse de la lécithine par la souche 18. | 39 |
| Figure 23 : Effectif des souches ayant pus hydrolysées les polymères tests réparties selon leurs origines d'isolement. | 40 |

Liste des Annexes

| Titre | Page |
|--|-------------|
| Annexe 1 : Préparation des milieux | 57 |
| Annexe 2 : coloration de Gram | 59 |
| Annexe 3 :Test de Catalase | 60 |
| Annexe 4 : Test d'oxydase | 60 |
| Annexe 5 : Milieux pour les tests enzymatiques | 61 |
| Annexe 6- Les caractères cultureux des souches | 62 |
| Annexe 7- Les caractères morphologiques des souches | 63 |
| Annexe 8- Caractérisation biochimiques des souches | 64 |
| Annexe 09 : Caractérisation biochimiques des souches bactériennes par la galerie Api 20E | 65 |
| Annexe 10- Activité hydrolytiques des souches | 66 |
| Annexe 11: Fermentation des sucres par les isolats | 67 |
| Annexe 12 : Appareillage | 68 |

Introduction

Introduction

Introduction :

Jusqu'au XXe siècle, il était considéré que la vie n'était possible que dans un environnement normal qui offre des conditions compatibles avec la vie humaine. Cependant, les chercheurs ont commencé à réaliser que certains environnements extrêmes tels que les régions volcaniques, les océans polaires, les lacs salés, les milieux alcalins ou acides et les sources hydrothermales étaient compatibles avec la vie humaine. Toutefois, ces sources ont été très peu étudiées en termes de biodiversité et ce n'est que récemment qu'on a commencé à se pencher sur les microorganismes présents dans ces environnements locaux (Kecha et al., 2007 ; Bouanane Darenfed et al., 2011). C'est le cas de Thomas Brock qui a découvert, dans les années 60, une espèce thermophile qui a joué un rôle crucial dans l'évolution de la biologie moléculaire : *Thermus aquaticus*. Cette espèce a été repérée dans les sources thermales du Parc de Yellowstone aux États-Unis, où elle est la source de la Tq polymérase, une enzyme utilisée pour élonger les brins d'ADN à haute température lors de la réaction de la chaîne de polymérase (PCR) (Podar et Reysenbach, 2006).

Parmi ces bactéries extrémophiles, les bactéries thermophiles, qui vivent et survivent principalement dans les sources chaudes, ont été moins étudiées en raison de problèmes d'isolement et de maintien en culture pure (Panda et al., 2013). Plusieurs nouveaux genres et espèces thermophiles ont récemment été décrits dans le cadre de leur étude, en raison de leur capacité à produire des molécules d'intérêt biotechnologique telles que les enzymes thermostables (Aanniz et al., 2015).

Dans le contexte actuel du changement climatique mondial, une demande croissante de procédés industriels durables et d'enzymes thermophiles est présente. Dans l'ensemble, les thermo-enzymes jouent un rôle crucial, car ils sont réputés pour être poly-extrémophiles (Kumar et al, 2019). La plupart de ces enzymes sont thermostables et peuvent être utilisées dans l'industrie (Asad et al, 2011). Non seulement ces enzymes sont thermostables, mais elles sont également plus résistantes aux produits chimiques que leurs homologues mésophiles, ce qui les rend particulièrement intéressantes pour les traitements industriels (Kumar et al, 2019). Le présent travail porte alors sur l'isolement et la caractérisation phénotypique des bactéries thermophiles provenant de la source hydrothermale de hammam Righa dans la région de Ain defla, ainsi que l'évaluation des activités enzymatiques des souches isolées. A cet égard notre mémoire est formé par deux parties :

Une partie bibliographique, divisé en deux chapitres :

Le premier chapitre intitulé par « Le monde extrémophiles », présente une généralité sur les extrémophiles, leurs diversités ainsi qu'une notion des sources hydrothermales avec les principales

Introduction

bactéries présentes dans ces sources.

Le deuxième chapitre intitulé par « Les applications biotechnologique des bactéries thermophiles », rassemble les principales enzymes des thermophiles et leurs mécanismes de stabilité à des conditions extrêmes suivi de description des différentes applications des thermo-enzymes en biotechnologie.

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

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

La partie consacrée aux résultats et à la discussion en donnant des résultats pertinents et clairement argumentés. Ce travail s'achève par une conclusion générale qui permettra de tirer quelques perspectives de prolongement à ce travail.

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I Chapitre I. Le monde extrémophile

I.1. Les microorganismes extrémophiles :

En 1974, MacELROY a créé le mot « extrémophiles » dans un journal intitulé « Some comment on the evolution of extremophiles ». Ce terme a été interprété de différentes manières et a finalement été lié aux microorganismes qui habitent des niches écologiques extrêmes qui présentent des conditions défavorables pour le développement d'une vie (Irwin, 2010).

L'extrémophile se distingue de la résistance aux conditions extrêmes en ce qui concerne le développement et le fonctionnement optimal des cellules dans ces conditions (Albers et al., 2001) .Il est possible que ces organismes se développent dans des environnements extrêmes, tels que des températures élevées ou basses, des pH acides ou alcalins, des concentrations élevées en sel, une pression élevée, un niveau élevé de radioactivité, une faible concentration en nutriments, une faible activité d'eau ou un stress oxydatif élevé (Tableau 1). Ils ont donc des systèmes biologiques qui peuvent être utilisés dans ces conditions (Macelroy, 1974) (Antranikian et al., 2005)

| Microorganismes extrémophiles | Environnement favorable à la croissance |
|---------------------------------------|--|
| Acidophile | pH optimum de croissance < 3 |
| Alcaliphile | pH optimum de croissance > 10 |
| Halophile | Nécessite au moins 1M de sel pour la croissance |
| Hyperthermophile | Croissance optimale à des températures > 80°C |
| Thermophile | Croissance à des températures entre 60°C et 85°C |
| Eurypsychrophile (psychrotolérant) | Croissance à des températures >25°C, mais également <15°C |
| Stenopsychrophile (psychrophile) | Croissance à des températures entre 10°C et 20°C |
| Piezophile | Croissance sous haute pression—> 400 atm (40MPa) |
| Endolithique | Croissance à l'intérieur des roches |
| Hipolithe | Croissance sur les roches et les déserts froids |
| Oligotrophe | Capable de croitre dans des environnements faibles on nutriments |
| Radorésistant | Tolérance aux fortes concentrations de métaux lourds |
| Toxitolérant | Tolérance aux fortes concentrations d'agents |

Materiel Et Méthodes

| | |
|-----------|---|
| | toxiques (solvants organiques) |
| Xerophile | Croissance en présence d'une faible disponibilité d'eau, résistance à la dessiccation |

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

I.2. La diversité des extrêmophiles

I.2.1. Les microorganismes extrêmophiles et la température

La température occupe une place primordiale dans notre environnement. En direct ou en indirect, elle a un impact sur les activités et la répartition des microorganismes.

n distingue trois catégories en fonction des températures de croissance idéales : les psychrophiles (moins de 20°C), les mésophiles (20-45°C) et les thermophiles (plus de 50°C). Dans les années 70, la découverte de microorganismes capables de se développer à des températures bien supérieures à cette limite a entraîné une réévaluation et une expansion de la notion de thermophile. (figure 1) (Madigan et Martinko, 2007).

Ces extrêmophiles sont classés en :

- **Les thermophiles :**

Sont des organismes qui se développent de manière optimale autour de 60°C (Nakagawa et al., 2004). Les extrêmophiles ont été particulièrement intéressés par ces enzymes car elles sont des sources thermostables d'enzymes telles que les amylases, les cellulases, les chitinases, les pectinases, xylanases, protéases, lipases et polymérase d'ADN (Mohammad et al., 2017)

- **Les hyperthermophiles :**

Sont des individus extrêmement résistants à la chaleur, avec des températures de croissance optimales allant de 80 à 110°C (figure 1) (Madigan et Martino, 2006).

- **Psychrophiles :**

Sont parfaitement développés à des températures inférieures ou équivalentes à 15 °C, avec un pic de croissance à 20°C, et ne peuvent pas croître au-delà de 20 °C (figure 1) (Irwin et Baird, 2004).

• Psychrotrophes :

Leur développement peut se produire à des températures inférieures ou équivalentes à 15°C, cependant, leur croissance optimale se produit à des températures supérieures ou équivalentes à 18°C (Irwin et Baird, 2004).

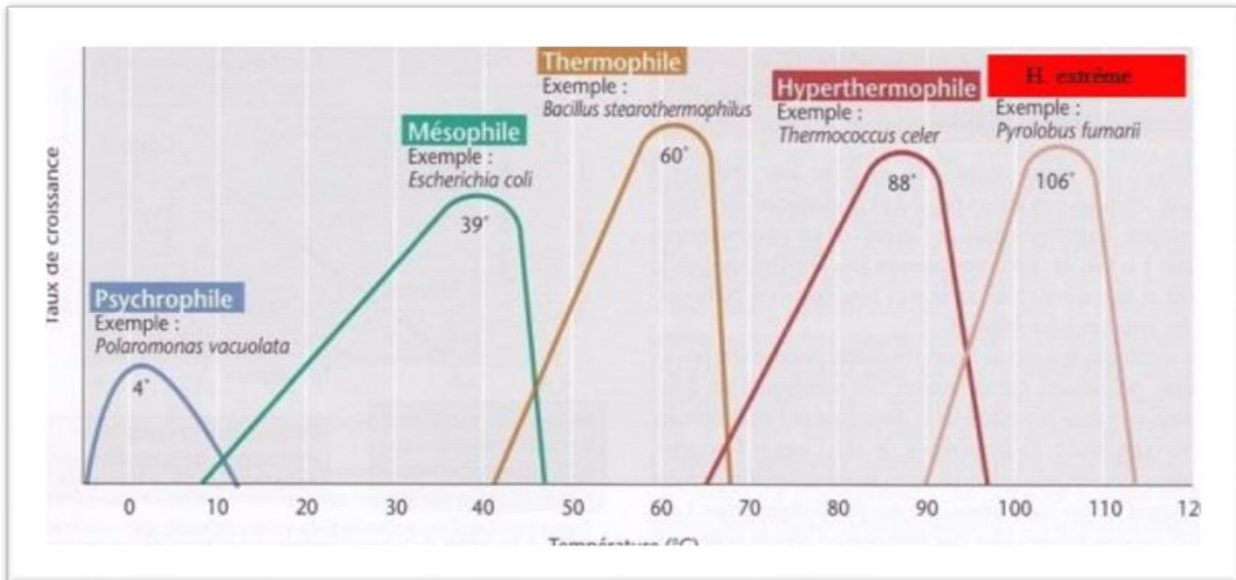


Figure 1 : Effet de la température sur les taux de croissance de microorganismes : psychrophiles, mésophiles, thermophiles, hyperthermophiles et hyperthermophiles extrêmes (Madigan et Martinko, 2007).

I.2.2. Microorganismes alcalophiles et acidophiles :

Les microorganismes, qui ne sont pas seulement capables de supporter des pH extrêmes, mais qui nécessitent ces conditions pour maintenir un métabolisme actif, sont appelés acidophiles et alcalophiles.

Les microorganismes appelés extrémophiles se distinguent par leur capacité à se développer à des températures froides ou chaudes (psychrophiles et thermophiles), leur capacité à se développer dans des milieux très acides ou basiques (acidophiles et alcaliphiles) et leur capacité à survivre en présence de concentrations élevées de sel (halophiles) (figure 2)

I.2.2.1. Microorganismes acidophiles

Les microorganismes acidophiles connaissent une croissance optimale à un pH de 2 (Morozkina et al., 2010).

I.2.2.2. Microorganismes alcalophiles

Les microorganismes alcalophiles se manifestent lorsque leur pH est égal ou supérieur à 9, avec un maximum de 10 à 12, tout en affichant une croissance très limitée près de la neutralité. Il n'y a pas seulement des microorganismes présents dans des habitats à pH neutre ou alcalin, mais ils peuvent

Materiel Et Méthodes

également se trouver dans des habitats acides (Horikoshi, 1999).

En règle générale, la réaction des microorganismes, notamment les alcalotolérants, à des pH alcalins requiert la présence des ions de sodium à l'intérieur des cellules pour la régulation et le métabolisme. (Lewinson et al., 2004).

Les produits provenant de microorganismes alcalophiles, notamment les enzymes, présentent un potentiel industriel considérable, principalement dans les secteurs de l'alimentation, des détergents, du papier et des tissus (Sarethy et al., 2011).

Outre les enzymes, les microorganismes alcalophiles génèrent d'autres substances qui ont un potentiel biotechnologique, comme les composés antimicrobiens et les caroténoïdes (Sarethy et al, 2011).

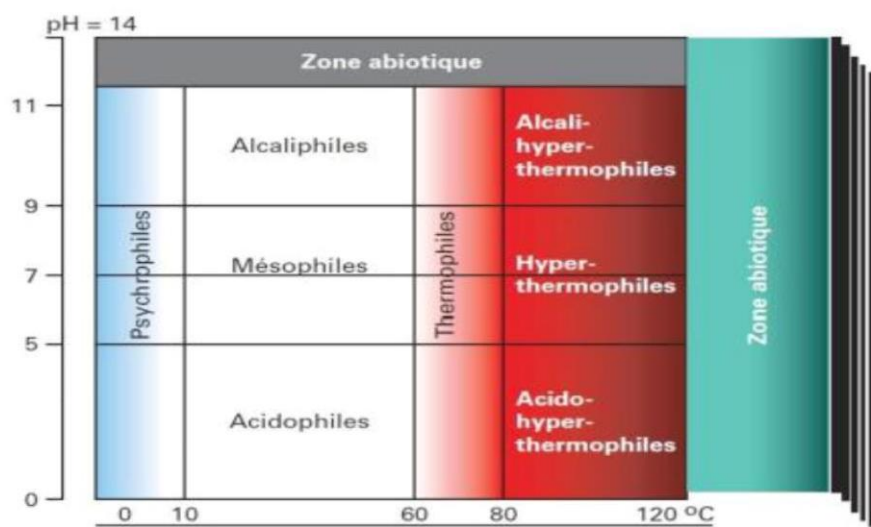


Figure 2 : Terminologie des extrêmophiles en fonction de la température (axe des X) et du pH (axe des Y) (Quérellou et Guézennec, 2010).

I.2.3. Microorganismes halophiles

Les bactéries halophiles se caractérisent par leur capacité à se développer uniquement en présence de sel, généralement sous forme de chlorure de sodium (NaCl).

On distingue trois catégories de bactéries halophiles : les légèrement halophiles (avec une croissance optimale entre 2 et 5 % de NaCl), les modérées halophiles (avec une croissance optimale entre 5 et 20 % de NaCl) et

Les halophiles extrêmes (avec une croissance optimale entre 20 et 30 % de NaCl). La plupart de ces microorganismes résident dans les eaux marines où la teneur en sel est proche de 3,5 %. (Gregoire et al., 2009)

I.3. Intérêt des extrémophiles

Au fil du temps, les extrémophiles ont développé une grande diversité de stratégies adaptatives. Les parasites extrémophiles offrent la possibilité de survivre dans des conditions extrêmes tout en se développant de manière optimale dans des environnements extrêmes (Quérellou et Guézennec, 2010).

La recherche sur les personnes extrémophiles apporte de nouvelles informations pour comprendre les mécanismes de la vie dans des conditions extrêmes et dévoile les mécanismes développés par les systèmes biologiques pour y faire face. Par la suite, ces connaissances sont utilisées pour créer de nouveaux produits et procédés bio dans différents domaines tels que les industries chimiques, pharmaceutiques, de beauté, de textile, de papier et alimentaire (Antranikian, 2009).

I.4. Les bactéries thermophiles

I.4.1. Définition des thermophiles

Les organismes thermophiles, qui dérivent du grec thermê, chaleur et philein, aimer, sont des êtres qui nécessitent une température élevée pour survivre. Ils appartiennent aux groupes extrémophiles. Les premiers ont été faits par Thomas D. Brock à la fin des années 1960 dans le parc national de Yellowstone (Figure 3).

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

Karl Stetter a proposé une définition plus pratique et plus étendue, qui désigne tous les organismes vivants qui se développent à des températures supérieures à 45°C. La définition finale est captivante car elle établit trois sous-catégories au sein des thermophiles :

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



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

I.4.2. Diversité (Phylogénie) des thermophiles

Il y a principalement des bactéries et des archées qui sont thermophiles, avec quelques eucaryotes qui peuvent pousser jusqu'à 60°C. Les genres bactériens de *Thermus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Rhodothermus* et *Thermoanaerobacter* sont considérés comme thermophiles, tandis que les genres archéens de *Methanobacterium* et *Thermoplasma*, *Aquifex*, *Thermotoga* et *Hydrogenobacter* sont signalés comme thermophiles (Figure 5) (kumar et al., 2019)

I.4.2.1-Bactéries

Les bactéries se trouvent partout et sont extrêmement variées. Ils ont la capacité de survivre dans divers environnements inhospitaliers. Les bactéries thermophiles sont des microbes qui se trouvent principalement dans des environnements chauds, ce qui leur permet de vivre et de survivre à des températures dépassant 70°C. En raison des problèmes d'isolement et de préservation de la culture pure, ils ont été moins explorés (Panda et al, 2013). La survie et la production d'enzymes thermostables et d'autres molécules bioactives à des températures élevées représentent un défi majeur pour ces bactéries (figure 4) (Alrumman et al, 2018).

I.4.2.2 -Archaea

Les archées sont un ensemble de micro-organismes procaryotes qui représentent le troisième domaine phylogénétique de la vie, avec la plus grande connaissance des Bactéries et des Eukarya. Autrefois, on croyait que les archées se restreignaient principalement à des environnements extrêmes et anoxiques. Cependant, il a récemment été démontré que la diversité archéologique, la richesse de la danse et les capacités métaboliques sont plus élevées que ce qui était supposé auparavant (Casamayor, 2009).

I.4.2.3 -Eucarya

La thermophilie n'est pas aussi prononcée chez les eucaryotes que chez les procaryotes. Généralement, les animaux à cellules multiples et les plantes ne supportent pas des températures supérieures à 50°C, et seules quelques espèces de mycètes et d'algues peuvent prospérer à des températures modérément élevées (~60°C). (GOMRI, 2012).

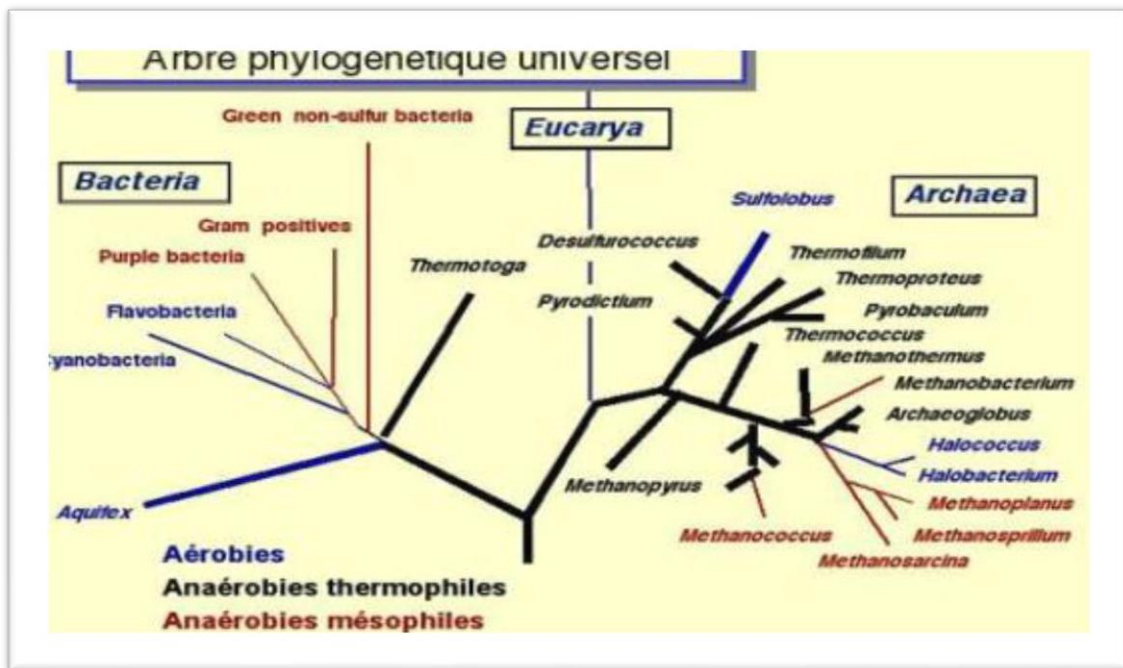


Figure 4: Arbre phylogénétique universel

I.4.3 Les principales bactéries thermophiles

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

I.4.4 Besoins nutritifs des bactéries thermophiles

Parfois, les bactéries thermophiles ont des besoins nutritifs spécifiques, voire même indispensables. Différents écrivains ont mentionné ces observations, tels que Sürücü (1999). Dans ses recherches, il met en évidence les exigences particulières des thermophiles en ce qui concerne les acides aminés, les vitamines et les minéraux. La méthionine était indispensable dans cette situation, tandis que l'histidine favorisait la croissance. La croissance était également stimulée par les vitamines B1 (thiamine) et B2 (riboflavine). En ce qui concerne les minéraux, il semble que le magnésium, ainsi que le calcium et le fer, jouent un rôle crucial.

Materiel Et Méthodes

Les recherches qu'il a menées ont également mis en évidence un effet synergique sur la nutrition dans ses cultures, car les espèces dominantes étaient moins exigeantes en termes de nutrition en culture mixte qu'en culture pure.

Il est crucial de repérer les facteurs physiologiques et environnementaux qui peuvent restreindre la croissance adéquate des bactéries thermophiles afin de mener à bien des applications industrielles telles que la production d'enzymes et de métabolites à partir de ces microorganismes. Effectivement, il existe différentes réactions secondaires qui peuvent se produire à des températures élevées. Cela se produit lorsque les produits de la réaction de brunissement de Maillard se forment rapidement à de telles températures. La réaction de Maillard se produit lorsque des sucres réducteurs tels que le glucose réagit avec des composés aminés tels que les acides aminés. Selon (Kim et Lee 2003), les produits de cette réaction ont un impact significatif sur la croissance de l'Archaea *Aeropyrum pernix*. Cependant, cette conclusion n'est pas définitive, car Einarsson et al., (1983) font référence à des recherches où les auteurs soutiennent que les produits de la réaction de Maillard favorisent la croissance microbienne, tandis que d'autres auteurs soutiennent le contraire.

La conversion du L-glutamate en L-pyroglutamate est un autre exemple de réaction secondaire, ce qui entraîne une inhibition importante de la croissance de l'Archaea *Sulfolobus solfataricus* (Park et al., 2001). Ces informations soutiennent que la transformation chimique des milieux de culture à des températures élevées joue un rôle essentiel dans la croissance efficace des thermophiles.

I.4.5 Les niches écologiques

Les thermophiles résident principalement dans des biotopes géothermiques, généralement liés à des zones tectoniques actives, mais ils peuvent également se trouver dans des biotopes chauds artificiels (Calteau, 2005).

I.4.5.1 Biotopes naturels

Les zones naturellement chauffées sont réparties entre les sites volcaniques terrestres (comme les solfatares), les sources hydrothermales terrestres, les systèmes hygrothermiques sous-marins (comme les sédiments, les volcans submersibles et les fumerolles), les sites souterrains, comme les réserves de pétrole, et les sols qui sont chauffés par le soleil.

I.4.5.1.1 Biotopes marins

L'eau de mer s'infiltré dans les fissures et se réchauffe au contact de la roche basaltique (ou roches profondes du manteau ou ultramaphiques) en fusion, pouvant atteindre des températures très élevées (jusqu'à 400 °C) puis, par d'autres fissures, remonte en surface. Ce fluide hydrothermal est riche en composés réduits tels que H_2S , CH_4 , NH_4^+ ainsi qu'en éléments métalliques tels que

Materiel Et Méthodes

Mn^{2+} , Fe^{2+} , Li^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} . Le mélange de ce fluide avec l'eau de mer froide ($2^{\circ}C$) provoque la précipitation de divers sulfures métalliques et de sulfate de calcium anhydre, origine des « fumeurs » et « diffuseurs », qui constituent progressivement les cheminées hydrothermales. C'est dans cette zone de mélange turbulent, entre le fluide hydrothermal toxique surchauffé et l'eau de mer oxygénée et froide, que se développe la vie hydrothermale (Minic et al., 2006) (Figure 5).



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

I.4.5.1.2 Biotopes terrestres :

Lorsque l'eau surchauffée se rapproche de la surface, la pression diminue et l'eau est projetée sous forme de jets ou de bulles d'eau chaude appelés geysers. Dans de nombreux endroits à travers le monde, on peut trouver des systèmes thermiques terrestres (en Islande, dans le Parc de Yellowstone aux États-Unis, en Nouvelle-Zélande, au Japon, en Algérie, etc.). Leur composition en minéraux, en nutriments et leur teneur en gaz présente des variations significatives, avec un pH variant de 1 à 10. Ainsi, les communautés microbiennes vivant dans ces régions thermiques présentent une grande diversité en termes de conditions physiques et géochimiques (Ferrera et Reysenbach, 2007).

Plus de 240 sources thermales sont présentes en Algérie, géographiquement réparties entre le Nord (en particulier dans les régions de l'Oranie, de la Kabylie et du Constantinois) et le Sud du pays (dans la région orientale du Sahara septentrional algérien) (Ouali et al., 2007). Les températures observées lors de l'apparition fluctuent de $22^{\circ}C$ à $98^{\circ}C$. La région Ouest enregistre les températures les plus élevées à Hammam Bouhnifia ($68^{\circ}C$), la région Centre à Hammam El Bibans ($80^{\circ}C$) et la région Est à Hammam Maskoutaine ($98^{\circ}C$). Dans la région Sud, il arrive parfois que certaines sources chaudes dépassent les $50^{\circ}C$ (Saibi, 2009).

I.4.5.2 Biotopes artificiels :

Les thermophiles résident aussi dans des environnements thermiques artificiels tels que les réseaux d'alimentation et les réservoirs d'eau chaude, les centrales nucléaires, les usines géothermiques, les puits et les forages de pétrole, le compost et les bioréacteurs (Ferrera et Reysenbach, 2007).

I.5. Écosystèmes à chaleur :

On peut trouver, dans le monde entier, des biotopes naturels où les microorganismes thermophiles peuvent se développer. Les zones géothermiques volcaniques terrestres et les événements hydrothermaux sous-marins sont des habitats à température élevée, à l'origine terrestre ou marine. Selon Satyanarayana et al. (2013), les zones géothermiques et volcaniques, telles que les fumerolles terrestres ou les solfatares, les geysers et les sources chaudes terrestres, sont les écosystèmes les plus réputés pour leur grande diversité de microorganismes thermophiles.

I.5.1. Les sources thermiques

I.5.1.1. Les sources thermales de l'océan.:

Il s'agit de sources d'eau profondes extrêmement chaudes, pouvant atteindre 350-400°C. Elles se développent au fond des océans dans les zones tectoniques actives, en particulier au niveau des dorsales. Il s'agit d'une émission due à la pénétration de l'eau de mer par des fissures du plancher océanique. En s'enfonçant, l'eau se réchauffe et sa densité diminue, ce qui entraîne sa remontée à la surface (Gargaud, 2005).

I.5.1.2. Les sources thermales de la Terre :

Il s'agit généralement de sources d'eau chaude chauffées par un système volcanique, où l'eau chaude géothermique provient du sol : les événements marins, les solfatares et les geysers (Gargaud, 2005). Ce sont des zones tectoniques actives, avec une fine couche de la coquille la plus externe de la terre. Selon Saghaleyan et al. (2021), il y a des microorganismes qui possèdent des caractéristiques inhabituelles de résistance à des conditions environnementales extrêmes

Ces milieux diffèrent en fonction des caractéristiques géologiques et des caractéristiques physico-chimiques, telles que les variations de température (Pandey et al., 2015) et de pH (Hussein et al., 2017). En règle générale, la température dans ces endroits dépasse 60°C, le seuil de la vie eucaryote (Pandey et al., 2015), mais une source naturelle peut être qualifiée de thermale si la température de son eau dépasse la température moyenne locale de 8,3°C (Liao, 2018). On les considère comme des environnements naturels favorables à la colonisation des thermophiles et sont

habituellement riches en archéobactéries et en bactéries chimio- autotrophes hyperthermophiles (Gargaud, 2005).

Outre son rôle d'habitat extrêmement solide pour des microorganismes riches en enzymes, ils sont intéressants pour la médecine, l'agriculture et l'industrie. On utilise également ces sources dans le domaine du thermalisme, de l'aquaculture, du chauffage de serres, de la climatisation et de la production d'électricité (Suleiman et al., 2020 ; Benziada, 2022).

I.5.2. Présentation de certaines sources hydrothermales

Au sein du monde On retrouve des sources géothermiques sur tous les continents, en Eurasie, en Amérique du Nord et du Sud, en Afrique, en Australie, en Océanie et dans l'Antarctique. Cependant, certaines régions sont plus concentrées que d'autres (Hussein et al., 2017). Ces organismes contiennent un grand nombre de microorganismes d'intérêt biotechnologique. Selon leurs températures, ces écosystèmes ont été divisés en sources à basse température, avec des températures inférieures à 55°C, et en sources à haute température, avec des températures supérieures à 55°C.

En fonction du pH, elles se classent en sources acides à un pH inférieur à 4, en acidités intermédiaires à un pH de 4 à 4, en neutres à un pH de 7 à 7 et en alcalines à un pH supérieur à 7. Enfin, en fonction de leur provenance, les eaux magmatiques des zones volcaniques et les eaux telluriques se forment lorsqu'ils traversent les roches chaudes profondes au moyen de courants d'eaux souterrains (CastelánSánchez et al., 2020). Selon Amarouche-Yala et al. (2015), les sources thermales les plus célèbres se trouvent dans les régions volcaniques, comme la Caldeira de Yellowstone, la Nouvelle-Zélande et l'Islande, où elles sont abondantes. En général, la biodiversité dans ces sources diminue lorsque la température augmente et que le pH diminue (CastelánSánchez et al., 2020).

En Algérie la diversité des niches écologiques extrêmes en Afrique du Nord est très étendue, avec une richesse microbiologique considérable. Les biotopes extrêmes de l'Algérie comprennent les sources chaudes, les lacs salins et les réservoirs pétroliers (Mechri et al., 2021). On la classe parmi les pays les plus riches en énergies géothermiques. Plus de 240 sources thermales sont disponibles à travers le monde, avec des températures variant de 19°C à 98°C (Bouacem et al., 2022).

Selon Benziada (2022), un tiers de ces sources présentent des températures supérieures à 45 °C. Les températures moyennes de différentes sources thermales en Algérie sont présentées dans le tableau I. En Algérie, il existe une grande quantité de sources chaudes, dont l'utilisation à des fins thérapeutiques est une tradition ancienne et bien établie (Amarouche-Yala et al., 2015). Bien que des recherches approfondies soient menées sur la diversité microbienne des sources chaudes terrestres à

Materiel Et Méthodes

travers le monde, les sources hydrothermales en Algérie restent très peu explorées, à l'exception de quelques rares études récentes sur les bactéries thermophiles présentes dans certaines sources (Benammar et al., 2020). Parmi les sources thermales les plus réputées en Algérie, on peut mentionner Hammam Melouane (Blida), Hammam Righa (Ain Defla), Hammam Médéa, Hammam Kséna (Bouira) (Benziada, 2022), Hammam EL Bibans (Saïda) et Hammam Debagh (Guelma) (Ait Ouali et al., 2019).

Tableau 2 : Localisations et températures de quelques sources thermales algériennes

| Sourcethermale | Localisation | Température(°C) |
|--------------------------------|---------------------|------------------------|
| Hammam Kiria | Béjaïa | 40 |
| Hammam AinMentila | Relizane | 32 |
| Hammam Righa | AinDefla | 67 |
| Hammam Melouane | Blida | 39 |
| Hammam Silal | Béjaïa | 42 |
| Hammam Kséna | Bouira | 61 |
| Hammam SidiYahiaAlAidli | Béjaïa | 50 |
| Hammam Meskhoutine | Guelma | 98 |
| Hammam Boutaleb | Sétif | 52 |

I.5.2.1. Présentation de la source thermale de Hammam Righa :

Hammam Righa est situé à 100 Km au sud-ouest d'Alger, Algérie (2°24' Est, 36°22' 60" Nord) (Bouacem et al., 2022), dans une région verdoyante et boisée de la wilaya d'Ain Defla, à une altitude de 525 mètres reliée à un hôpital militaire et quelques établissements. L'hôpital est alimenté par neuf sources hyperthermales à une température avoisinant les 54°C (Ouali, 2008).

II. Chapitre II : Application biotechnologique des bactéries thermophiles

II.1. Les thermo enzymes :

Les thermo-enzymes sont les enzymes thermostables, également appelées « thermo-enzymes », sont des macromolécules provenant de microorganismes thermophiles de nature protéique, qui se distinguent par leur activité catalytique qui régule des réactions biochimiques particulières (Alain., 2003). Les thermo-enzymes sont souvent plus stables et faciles à utiliser, ce qui en fait des outils particulièrement intéressants pour de nombreuses applications. Elles permettent, d'une part, de diminuer le nombre d'étapes dans certains procédés industriels, d'accroître la productivité, et d'autre part d'explorer de nouveaux domaines d'application en raison de leur résistance à la température (Haki et Rakshit, 2003). L'augmentation du pairage ionique, l'augmentation des interactions hydrophobes (par exemple à l'interface des sous-unités), la diminution du ratio surface/volume (« packing efficiency »), l'augmentation du nombre de ponts disulfures et hydrogènes, la diminution des contraintes conformationnelles et la stabilité des boucles sont les principaux facteurs qui favorisent la stabilité des enzymes thermophiles (Hupé, 2008). Les enzymes thermostables sont les molécules les plus importantes dans le domaine de la biotechnologie.

II.1.1. Amylases :

Les amylases sont des enzymes qui scindent l'amidon en rompant les liaisons α -1,4-O-glycosidiques internes afin de produire différents produits, tels que le glucose et le maltose. Effectivement, elles sont responsables de réactions hydrolytiques impliquant l'amylose (amidon non ramifié), l'amylopectine (amidon ramifié), le glycogène (amidon animal) et des polymères de glucoses similaires (Allala, 2020). Les α -amylases (EC 3.2.1.1) et les β -amylases (EC 3.2.1.2) sont les deux types d'amylases (Gupta et al., 2003).

L'enzyme hydrolytique thermostable idéale est l' α -amylase, qui offre un modèle intéressant pour l'analyse des fondements structural de la thermostabilité des protéines. L' α -amylase thermostable est produite par *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus amyloliquefaciens*, qui ont été largement utilisées pour la production commerciale de l'enzyme dans différentes applications (Prakash et Jaiswal, 2010). La bactérie thermophile *Tepidimonas fonticaldi* HB23 est isolée de la source hydrothermale Hammam Righa et produit une enzyme thermostable de type α -amylase (Allala, 2020).

Les amylases microbiennes thermostables présentent de nombreux bénéfices, tels que leur obtention à des coûts abordables, une réduction du temps de production et une simplification des processus de modification et d'optimisation. L'amylase est couramment employée dans les secteurs de l'alimentation, du textile, du papier et de la pharmacie (Al-Johani et al., 2016) ainsi que dans

différentes applications. La dégradation des déchets organiques, l'hydrolyse des matières premières, l'amélioration de la digestion des matières premières chimiques et le bio blanchiment de la pâte sont des éléments environnementaux importants. Ces éléments sont utilisés dans la boulangerie, les fermentations, la production d'alcools et de bières hypocaloriques, les détergents, la production de sirop de maïs et de chocolat, la purification des jus de pomme et de poire, la production de malt et l'élimination de la viscosité dans l'industrie du papier (Saeed et al., 2021).

II.1.2. La cellulase :

La cellulose présente un grand potentiel pour la transformation de bioproduits à valeur ajoutée en tant que ressource renouvelable. Les cellulases produites par les bactéries cellulolytiques peuvent la détruire (Rigoldi et al., 2018). On distingue trois catégories d'enzymes cellulases : les exoglucanases (EC 3.2.1.91), les endoglucanases (EC 3.2.1.4) et la β -glycosidase (EC 3.2.1.21) (Sahoo et al., 2020). L'hydrolyse enzymatique complète de ce polysaccharide requiert l'intervention synergique de trois enzymes afin de transformer la cellulose en monomères de glucose. Effectivement, les cellulases jouent un rôle essentiel en transformant la liaison β -1,4 glycosidique de la cellulose en glucose (Potprommanee et al., 2017), qui est adapté à la consommation humaine (Sahoo et al., 2020). Il est possible de fermenter ces sucres afin de produire du bioéthanol et des produits biosourcés (Shabih et al., 2018). Dans l'industrie textile, les cellulases sont également employées pour le polissage des tissus et dans l'industrie des détergents à lessive (Rigoldi et al., 2018). Différentes cellulases ont été isolées et analysées à partir des bactéries thermophiles : *Thermotoga maritima* (Bronnenmeier et al., 1995), *Caldocellum saccharolyticum* (Te'o et al., 1995), *Thermotoga neapolitana* (Bok et al., 1998), *Anaerocellum thermophilum* (Zverlov et al., 1998). Au fil des années, de nombreuses autres cellulases thermostables nouvellement identifiées (*Bacillus*, *Streptomyces*...etc.) ont été purifiées et analysées (Azadian et al., 2016 ; Budihal et al., 2016 ; Zarafeta et al., 2016).

II.1.3. Lipases

Les lipases sont les enzymes les plus fréquemment employées dans le domaine des biocatalyses. Effectivement, ces macromolécules, appelées triacylglycérol acylhydrolase (EC 3.1.1.3), ont pour objectif de cibler les liaisons ester carboxyliques. Elles font partie de la famille des hydrolases et de la classe des sérines hydrolases (Chandra et al., 2020). Leur potentiel spécifique de biotransformation est largement contesté (Rabbani et al., 2014). Outre leur capacité à hydrolyser, elles ont la capacité d'inverser la réaction dans des conditions anhydres afin de réaliser des activités d'estérification, d'aminolyse et d'alcoolyse, qui jouent un rôle crucial dans de nombreuses industries (Chandra et al., 2020). Elles transforment les triacylglycérols insolubles en acides gras libres, mono

et diacylglycérols, ainsi que le glycérol. (Bhardwaj et al. (2017).

Les biocatalyseurs les plus couramment employés dans les domaines de l'environnement et de l'industrie sont les lipases microbiennes (Verma et al., 2021). Les réactions catalysées par les lipases offrent des résultats de qualité supérieure et une consommation d'énergie inférieure à celle des méthodes traditionnelles (Rabbani et al., 2014). Grâce à des performances élevées, et avec une réduction des sous-produits ou des produits secondaires indésirables (Verma et al., 2021).

Les microorganismes thermophiles produisent des lipases qui demeurent actives dans les solvants organiques, ce qui accroît leur potentiel et leur souplesse en tant que biocatalyseurs. Ils sont principalement utilisés dans la production de précurseurs de composés pharmaceutiques actifs et dans la transformation de graisses et d'huiles naturelles en produits de grande valeur tels que le cacao, le beurre et les acides gras oméga-3 enrichis en huile (Bhardwaj et al., 2017). Les lipases mésophiles sont impliquées dans des réactions inobservables. Les températures, le pH, la salinité et la pression sont des facteurs qui les rendent actives (Verma et al., 2021). Toutefois, la plupart des lipases actuellement disponibles sur le marché proviennent de sources fongiques (Li et al., 2016).

II.1.4. Chitinase :

La chitine est un polysaccharide linéaire composé de résidus de N-acétylglucosamine, élément structural principal de la plupart des mycètes et de quelques invertébrés. Ce polymère est dégradé par les chitinases, qui sont très présentes dans les organismes animaux, végétaux et fongiques. Les endo-hydrolases de chitine (Chitinases A: EC 3.2.1.14), les oligomères exo-hydrolases (Chitinases B: EC 3.2.1.52) et la N- acétyl-D-glycosaminidase (Chitobiase: EC 3.2.1.30) sont leurs composants (Antranikian et al., 2005 ; Antranikian, 2008).

Les chitinases thermostables jouent un rôle essentiel dans les domaines industriels qui exigent des conditions de traitement à haute température, tels que la fabrication de biocarburants à partir de biomasse végétale. Elles servent à l'hydrolyse de la chitine et à la bioconversion des déchets chitineux, ce qui ouvre la voie à des applications potentielles dans différents domaines tels que la biotechnologie, la biomédecine, l'agriculture et la nutrition (Bouacem et al., 2018).

II.1.5. Protéase :

Les enzymes protéolytiques, ou protéases, sont des enzymes présentes dans tous les organismes vivants. Elles sont très appréciées tant sur le plan physiologique que commercial (Lalmanach, 2008). La catégorie des hydrolases comprend les protéases, qui sont l'une des enzymes hydrolytiques les plus importantes et les plus étudiées. Plusieurs critères clés sont utilisés pour classer ces plantes, tels que la longueur de la chaîne polypeptidique, leur mécanisme d'action, la

nature du résidu nucléophile de leur site actif, leur structure tridimensionnelle et leur origine évolutive (Gupta et al., 2002).

II.1.6. Les xylanases :

Jouent un rôle crucial dans la décomposition enzymatique de l'hémicellulose, dont le xylane est le principal composant, afin de produire des sucres monomères. Ces enzymes hydrolytiques (hydrolases O- glycosidique) sont responsables de la liaison β -1, 4-xylosidique du xylane, un composant essentiel de la paroi cellulaire végétale (Dubnath et al., 2019). La production de sucre à partir des biomasses lignocellulosiques suscite de plus en plus d'intérêt pour ces enzymes, qui sont maintenant utilisées dans de nombreuses industries de transformation, comme la pâte à papier, l'alimentation et le textile (Rigoldi et al., 2018 ; Bouacem et al., 2014). Les xylanases sont produites par des bactéries thermophiles du genre *Thermoanaerobactrium*, *Thermotoga*, *Alicyclobacilus*, *Anoxybacillus* et *Cellulomonas*.

II.2. Application biotechnologique

Il existe deux catégories d'applications distinctes : La biolixiviation est l'une des premières applications envisageables, principalement utilisée pour concentrer les métaux (cuivre, or et uranium). (Williams et al. 2009).

Le deuxième type d'applications repose sur l'utilisation des biomolécules qui proviennent des extrêmophiles ; les enzymes, ainsi que les protéines, les lipides, les polymères et d'autres métabolites secondaires, sont responsables.

II.2.1. Applications basées sur les biomolécules

Elles constituent la méthode la plus répandue d'utilisation des thermophiles, avec des biomolécules principalement composées d'enzymes, mais aussi d'autres substances de diverses natures.

II.2.1.1. Les enzymes

Ces enzymes provenant de microorganismes qui sont thermophiles ou hyperthermophiles sont encore peu utilisées dans les procédés industriels, car elles ne satisfont pas parfaitement aux exigences industrielles ou que leur remplacement par des enzymes classiques est trop onéreux. En revanche, ces enzymes sont couramment utilisées en biologie moléculaire.

- **Enzymes des acides nucléiques :**

Les technologies de l'ADN recombinant utilisent différentes enzymes telles que les enzymes de restriction, les ADN polymérase, les ADN ligases, et bien d'autres encore. Dans les techniques d'ingénierie du vivant, les ADN polymérase thermostables jouent un rôle essentiel en amplifiant un

gène spécifique à des millions de copies in vitro par PCR, (Querellou et al.,1999), amplification isotherme, etc. La Taq polymérase, isolée de la bactérie *Thermus aquaticus*, est l'enzyme la plus couramment employée en PCR. De nombreux secteurs sont particulièrement à la recherche de nouvelles ADN polymérases : Le bioterrorisme vise à obtenir des polymérases d'ADN fonctionnelles dans des conditions extrêmes (avec la présence de solvants et d'autres inhibiteurs) (Palud et al.,2008).

- **Estérases :**

Les enzymes hydrolysent les esters afin de produire de l'alcool et de l'azote. Elles ont la capacité de provoquer la réaction inverse ou une trans-estérification dans un solvant organique. La différence entre les estérases et les lipases réside dans leur préférence pour les chaînes carbonées courtes et leur inactivité sur les substrats qui forment des micelles.

De nombreuses applications ont été trouvées dans les secteurs médical, agroalimentaire et de production d'énergie, en raison de leurs caractéristiques en synthèse organique (comme les arômes, les détergents et le biodiesel notamment), entre autres. Plusieurs estérases d'archées ont été identifiées depuis la découverte de la première carboxylestérase de *Sulfolobus acidocaldarius*, en 1988. On n'a isolé la première lipase que récemment, chez l'archée hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus* (Levisson et al., 2009).

- **Enzymes dégradant les polysaccharides :**

Les glycosylases sont des enzymes de la famille des glycosylases qui jouent un rôle dans le métabolisme des glucides. Notamment, celles qui transforment l'amidon et celles qui dégradent la cellulose et la lignocellulose jouent un rôle essentiel dans les méthodes de fabrication de biocarburants. Egorova et al.,2007).

- **Les protéases :**

Les protéases jouent un rôle crucial en raison de leur utilisation systématique dans le secteur laitier et les détergents. Dans l'industrie laitière, les protéases ont un impact sur le processus de caillage du lait lors de la fabrication du fromage, et elles peuvent également avoir un impact sur la saveur des produits. En ce qui concerne les détergents, ils facilitent l'élimination des taches protéiques. Les protéases sont également utilisées dans divers secteurs tels que l'alimentation, le textile, le tannage et les pâtes et les papiers. Elles sont utilisées dans ce dernier domaine d'application pour le blanchiment des pâtes et le nettoyage des équipements (élimination du biofilm) (Barnabe et al., 2003 ; Kirk et al.,2002).

II.2.1.2 Applications basées sur cellules entières :

Celles-ci concernent des applications où l'utilisation de biomolécules purifiées à partir des cultures est inefficace ou des applications qui nécessitent l'intervention directe d'une population microbienne, voire d'un mélange complexe d'espèces différentes :

- **Biolixiviation des métaux :**

Les métaux (cuivre, uranium) sont principalement concentrés par lixiviation microbienne ou biolixiviation lorsque les concentrations initiales du minerai sont faibles et que les procédés chimiques conventionnels ne sont pas rentables.

Cependant, il est crucial de limiter la contribution des composés sulfurés inorganiques réduits à la formation d'un film de passivation à la surface des métaux, ce qui entraînerait une diminution des rendements d'extraction. Lorsque la biolixiviation est réalisée à une température élevée avec des espèces thermo- acidophiles, cette passivation est supprimée. (Rawlings et al.,2007).

- **Piles à combustible microbienne :**

Dernièrement, une communauté microbienne thermophile isolée de sédiments marins a été prouvée capable de générer un courant électrique dans une pile à combustible à 60 C° en utilisant de l'acétate comme carburant. (Mathis et al.,2008).

- **Production d'hydrogène :**

L'utilisation des sources renouvelables est de plus en plus intéressante pour répondre aux besoins énergétiques de plus en plus importants à l'échelle mondiale. L'éthanol, le méthane et l'hydrogène sont des produits de la fermentation anaérobie. L'étude de la production biologique d'hydrogène est devenue intéressante pour des utilisations potentielles du biohydrogène en tant que source d'énergie propre. La production de biohydrogène est basée sur l'utilisation de substrats organiques et pourrait parfaitement être combinée à une production d'énergie avec un traitement des déchets organiques. (Antranikian,2008).

MATERIEL

ET

METHODES

MATERIEL ET METHODES

Il sera abordé dans ce chapitre le protocole d'échantillonnage ainsi que les analyses physico-chimiques et microbiologiques réalisées dans le laboratoire pédagogique de microbiologie.

I. Matériels

I.1. Verrerie

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

I.2. Appareillage

Agitateur, Vortex, Balance, multi paramètre, Bec bunsen, Autoclaves, Etuve, Bain marie, Incubateur, Réfrigérateur, Microscope optique.

I.3. Milieux culture

Bouillon nutritif, bouillon nutritif à base de l'eau de source, gélose nutritif, gélose nutritif à base de l'eau de source, gélose à l'amidon, gélose à base de l'eau de source à l'amidon, , gélose Tween 80, gélose à base de l'eau de source Tween 80, , gélosé à base de lait écrémé, gélosé base de l'eau de source à base de lait écrémé , gélose au jaune d'œuf , gélose de l'eau de source au jaune d'œuf , gélose à base de Huile d'olive , gélose à base de l'eau de source à base de Huile d'olive .

I.4. Autres produits consommables

Lugol, fusin, violet de gentiane, alcool, kovax, nitrate 1 et 2, VP 1 et 2, zinc, L'eau distillé, l'eau physiologie

I.5. Autres matériels :

Entonnoir, Eprouvette, Spatule, barreau magnétique, anse à platine, embout, Pissette, Micropipette, Boites de pétri.

II. Méthodes

II.1. Protocole d'échantillonnage

Afin de rendre les résultats d'analyses microbiologiques plus scientifiques, deux fourages d'eau ont été utilisés pour l'échantillonnage des eaux. Le processus d'échantillonnage a eu lieu sur une seule période le 21 Février 2024. Les échantillons d'eau ont été prélevés dans des flacons stériles de 250 ml et sont transportés au laboratoire dans une glacière à une température de 4°C.



Figure 6 : Sources hydrothermales de Hammam Righa.

II.2. Paramètres physico-chimiques

On a mesuré sur le terrain les paramètres physico-chimiques tels que la température, le pH à l'aide d'un multi paramètre (WTW Multi 340i/set) et (WTW Multi 3320 SET 1).



Figure 7 : la mesure des paramètres physico-chimiques par multi paramètre

II.3- Analyses microbiologiques

Les différentes analyses microbiologiques sont : l'enrichissement, l'isolement et la purification l'identification biochimique des isolats et la détection des activités hydrolytiques extracellulaires.

II.3.1 Enrichissement, isolement et purification des isolats

La culture des microorganismes est essentielle pour enrichir et isoler ces derniers, que ce soit dans des milieux de culture liquides ou solides. On a utilisé deux milieux de culture, dont un qui utilise de l'eau de source. Ces environnements sont peu sélectifs, visant à favoriser la prolifération des bactéries thermophiles. (Neusely da Silva, Marta Hiroto Taniwaki, et al, 2013)

L'enrichissement a été effectué dans 9ml de bouillon nutritive de base et un bouillon nutritif avec l'eau de source dans les quels 1ml de chaque eau de source a étéensemencé, par la suite les bouillons sont incubée à 55°C pendant 48h. (jusqu'à l'apparition de trouble) (K.Alef, 1995)

On procède à l'isolement par ensemencement en étirant 0,1 ml du bouillon d'enrichissement et en incubant à 55°C pendant 24 à 72 heures, ce qui permet la croissance de divers groupes de microorganismes (cultures mélangées). La technique Streak-plate permet d'obtenir des cultures pures en séparant les différentes colonies dans un milieu nutritif avec de l'agar. (Harley et Prescott, 2002).



Figure 8: Enrichissement sur bouillon nutritif

II.3.2. Identification des isolats

Les isolats sont identifiés grâce à une analyse culturelle et morphologique, ainsi qu'une analyse biochimique.

II.3.2.1.- Caractérisation culturelle et morphologique

Cette description repose sur l'identification de deux éléments :

La taille, la forme, la pigmentation, le relief... etc. sont mesurés à l'œil nu après une incubation de 24 à 48 heures sur un milieu solide.

On évalue l'aspect microscopique en utilisant un microscope photonique (Motic SFC-28) en effectuant deux examens. Le premier consiste à examiner les suspensions bactériennes à l'état frais, ce qui permet d'observer les bactéries vivantes, leur mobilité, leur forme et leur mode de regroupement.

Le second procédé consiste en la coloration différentielle expliquée par Gram (1884), qui repose sur les caractéristiques structurales de la paroi bactérienne, ce qui a permis de séparer le monde bactérien en deux groupes : Gram+ et Gram-. Elle permet d'observer leur disposition et la présence des spores.

II.3.2.2. Caractérisation biochimique

Les tests utilisés pour évaluer les caractères biochimiques comprennent : la détection des enzymes respiratoires, le test de Mannitol-Mobilité et le système Api 20 E.

II.3.2.2.1 Mise en évidence des enzymes respiratoires

L'activité respiratoire est mise en évidence par deux enzymes : la catalase et le cytochrome oxydase.

- **Catalase :**

La catalase est une enzyme qui transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène ($2H_2O_2 +$ Catalase

→ $2H_2O + O_2$) Marchal et Bourdon., 1982, ce qui en fait un élément de différenciation efficace utilisé dans le domaine de la systématique bactérienne. On procède à un frottis bactérien à partir des colonies prélevées avec précaution sur une gélose, puis on ajoute quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène. La présence de catalase se manifeste par la formation immédiate de bulles.

- **Cytochrome oxydase :**

Ce test révèle l'existence du cytochrome oxydase, une enzyme qui catalyse une réaction

d'oxydoréduction. Le réactif N diméthyle paraphenylene diamine peut être oxydé par cette enzyme en dérivé violet. La méthode implique de placer la colonie à tester sur un carré d'oxydase et de laisser agir. Après quelques instants, voit si la couleur violette apparaît ou non. La teinte violette indique la présence de l'oxydase.

II.3.2.2.2. Test Mannitol - mobilite

Grâce à ce test, il est possible d'évaluer la fermentation du mannitol ainsi que la mobilité des souches dans un milieu semi-solide appelé "Mannitol-Mobilité". Cette mobilité est signalée par l'envahissement du milieu à partir de la piqure d'inoculation, tandis que la fermentation du mannitol se manifeste par un changement de couleur du milieu de culture vers le jaune (Harley et Prescott, 2002).

II.3.2.2.3. Le système api20 E

Les tests biochimiques peuvent être réalisés à partir de cultures bactériennes pures appropriées dans les milieux d'isolement primaire grâce au système Api 20 E. Une fois que la suspension bactérienne a été introduite dans les micro-tubes contenant des substrats déshydratés, les réactions qui se produisent après 48 heures d'incubation à 55°C se manifestent par des changements colorés spontanés ou révélés par l'ajout de réactifs. Le tableau de lecture est utilisé pour interpréter les réactions produites, tandis que l'identification est réalisée à l'aide du catalogue analytique joint à la plaque. Selon Harley et Prescott (2002).

II.3.3. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

La recherche qualitative sur les hydrolases extracellulaires des souches bactériennes est réalisée en modifiant le milieu solide en réduisant la source organique (milieu de base) et en ajoutant un polymère-test (Demirjian, Shah et Morís-Varas, 1999 ; Tholey et Heinzle, 2002). On peut mesurer l'activité hydrolytique extracellulaire en mesurant l'activité amylolytique, protéolytique, lipolytique, cellulolytique et l'hydrolyse de l'acide désoxyribonucléique (ADN).

II.3.3.1 Détermination de l'Activité Amylolytique

L'amidon est un polymère polysaccharide du glucose composé d'amylose et d'amylopéctine. Après 72 heures d'incubation à 55°C, on observe la dégradation de ce polymère par les isolats bactériens grâce à un milieu de base additionné de 1% (p/v) d'amidon . Selon Camille (2014), la lecture est effectuée en inodant les boîtes avec une solution de lugol, ce qui entraîne la production d'amylase qui se manifeste par la formation d'un halo d'éclaircissement autour de la colonie.

II.3.3.2 Détermination de l'activité lipolytique

L'activité lipolytique est mise en évidence par l'hydrolyse de la lécithine et du Tween 80 et l'huile d'olive.

- **Hydrolyse du tween 80 :**

En ensemencement des souches sur un milieu à base de Tween 80, une réaction positive se manifeste par l'apparition d'une auréole opaque autour des colonies après 72 heures d'incubation à 55°C (Harley et Prescott, 2002).

- **Hydrolyse de la lécithine :**

Après avoir placé les souches sur une gélose nutritive contenant de l'émulsion de jaune d'œuf stérile, l'apparition de toute zone claire autour de la culture après 72 heures d'incubation à 55°C indique que la souche est à l'état de lécithinase (Camille, 2014)

- **L'hydrolyse de l'huile d'olive :**

L'huile d'olive est principalement composée de triglycérides, des molécules constituées de trois acides gras liés à une molécule de glycérol. Lors de l'hydrolyse, ces triglycérides se décomposent en leurs éléments constitutifs : les acides gras et glycérol

Elle est catalysée par des enzymes, comme les lipases, présentes naturellement dans les olives ou ajoutées lors de la transformation. C'est la principale réaction d'hydrolyse qui se produit dans le corps humain lors de la digestion des lipides.

II.3.3.3- Détermination de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est mise en évidence par l'hydrolyse de la caséine.

- **Hydrolyse de la caséine :**

On étudie l'activité protéolytique en ensemencant les souches sur une gélose au lait. On incube les souches testées pendant 1 à 2 jours à une température de 55°C. Selon Priest et al. (1988), une activité caséinolytique se traduit par la formation d'un halo clair autour des colonies après l'hydrolyse de ce polymère.

Résultats

Et

Discussion

Résultats Et Discussion

Résultats Et Discussion

Dans ce chapitre il sera question de présenter les résultats d'analyses physico-chimiques et biologiques des sources thermales étudiées.

I. Profil physico-chimiques des sources thermales

Le tableau présente les caractéristiques physico-chimiques de source thermale du hammam Righa. Ces profils sont révélés grâce à divers paramètres mesurés, tels que : La température, ph (tableau 3)

Tableau 3. Paramètres physico-chimiques de source thermale étudiée

| Source | Température (°C) | pH |
|--------------|------------------|------|
| Hamмам righa | 62 °C | 5,77 |

Hamмам Righa a été sélectionné en raison de ses caractéristiques physicochimiques exceptionnelles, notamment sa température élevée, qui est le principal facteur qui caractérise cette source hyperthermale, atteignant ainsi 62°C (Amarouche et al, 2015) . Cette ressource peut être considérée comme une ressource assez peu exploitée pour identifier les microorganismes thermophiles et les enzymes présentant des caractéristiques intéressantes pour une utilisation industrielle, voire pour la création de nouvelles molécules bioactives.

II. Profils microbiologiques

II.1. Diversité des souches bactériennes

Les souches bactériennes isolées à partir de la source thermale sont composées de 17 souches différentes. (Tableau 4) (figure 9)

Tableau 4 : Nombre des souches isolées dans deux milieux de culture

| Source | GN | GN+ eau de sources |
|--------------|----|--------------------|
| Hamмам Righa | 6 | 10 |

GN : Gélose nutritif

Résultats Et Discussion

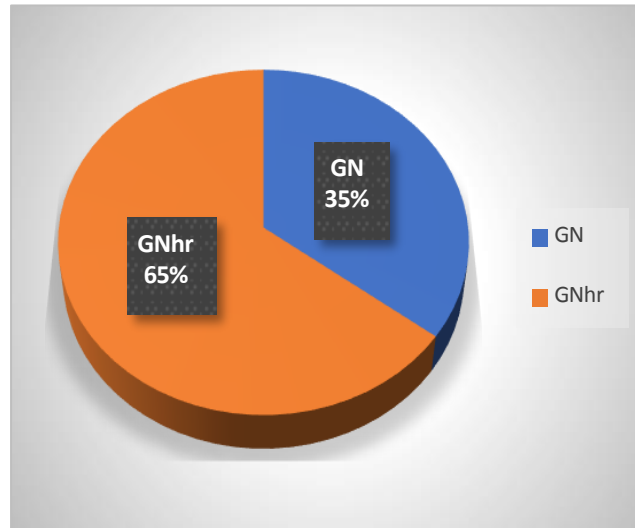


Figure 9.- présentation graphique de la répartition spatiale des souches isolées dans milieu de culture (GN, GNhr)

GN : Gélose nutritif

GNhr : Gélose nutritif + eau de sources

Les différents environnements de culture utilisés pour cette étude ont permis l'identification de 17 souches qui présentent des caractéristiques culturelles variées. La plupart sont de forme bacille et filamenteuse, avec des structures lisses ou ondulées. Les isolements initiaux ont démontré une croissance rapide (18 à 24 heures d'incubation) dans les deux environnements (GN, GN + eau de la source). Ces environnements sont employés afin de choisir une variété étendue de microorganismes thermophiles provenant de divers groupes taxonomiques. (Fooladi et Sajjadian, 2010).

La source de hammam Righa fournit un plus grand nombre de souches isolées, ce qui est principalement dû aux conditions de culture (55°C), qui ont favorisé une adaptation optimale des souches isolées, car ces conditions sont les plus proches de leur environnement naturel. En général, les bactéries thermophiles présentent une grande similitude avec leur milieu de vie. (Javed et al, 2012).

II.2 Identification des isolats

Les souches bactériennes sont identifiées en se basant sur leurs caractéristiques culturelles et morphologiques, et sur leur biochimie.

II.2.1 Détermination des caractères cultureux et morphologiques

Le diagnostic culturel et morphologique repose sur les caractéristiques microscopiques et macroscopiques des échantillons.

II.2.1.1 Aspect macroscopique

Grâce à l'observation macroscopique des souches dans les deux milieux, il a été possible d'observer deux types de colonies distincts.(annexe 6)(figure 10,11)

- **Colonies de type lisse (L)**

On retrouve le type lisse chez 7 souches bactériennes. La majorité des souches bactériennes des deux fourrages présentent cette morphologie lisse. En général, les souches avec cette morphologie sont de couleur blanche, voire transparente dans certains cas. Ils ont une surface lisse.

- **Colonies de type rugueux (R)**

Chez 10 souches bactériennes, le type rugueux est présent. Le plus grand nombre des souches bactériennes des deux fourrages ont cette forme rugueuse. La plupart du temps, les souches présentant cette morphologie sont de couleur blanchâtre, crémeuse, jaunâtre et transparente.

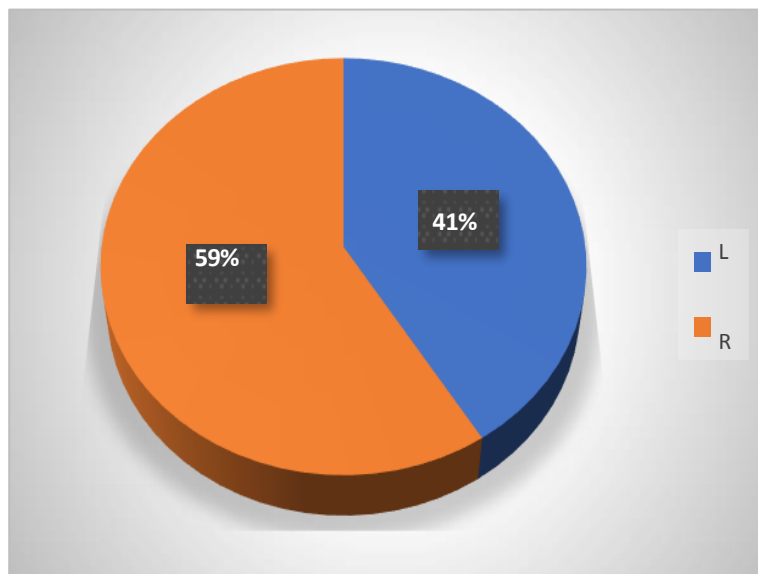


Figure 10- Diagrammes en secteurs présentent l'aspect macroscopique des souches (L : lisse ; R : rugueux).

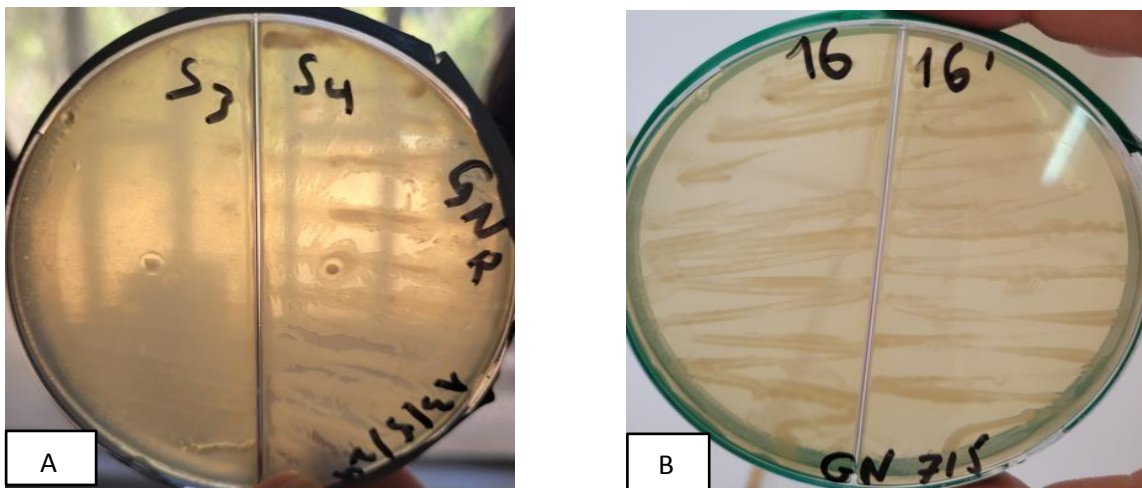


Figure 11 : Aspect macroscopique de souches isolées cultivées sur différents milieux., **A** : souche 3 type rugueuse jaunâtre, souche 4 type lisse translucide , **B** : souche 16,16' type lisse translucide .

II.2.1.2 Aspect microscopique

Les cultures jeunes ont été colorées avec Gram, ce qui a permis de détecter des souches à Gram positif et à Gram négatif. (Annexe 7) (figure 12,13)

- **Souches à Gram positif**

Les souches à Gram positif ont été identifiées grâce à la coloration de Gram sur des cultures jeunes. Les formes cellulaires observées au microscope photonique sont les suivantes :

- On observe la présence de la forme bacille et bacille filamenteuse chez 7 souches issues de la soure de Hammam Righa.
- On trouve la forme coccobacille chez une seule souches.
- La forme coque est rencontrée uniquement chez une seule souche isolée
- On observe la présence de la forme filamenteuse chez 3 souches.

- **Souches à Gram négatif**

Les souches bactériennes isolées lors de cette étude sont composées de 5 souches à Gram négatif, dont 2 sont bacilles et 3 sont filamenteuses.

Dans l'ensemble de ces formes, les bacilles à Gram positif sont les plus prédominants.

Résultats Et Discussion

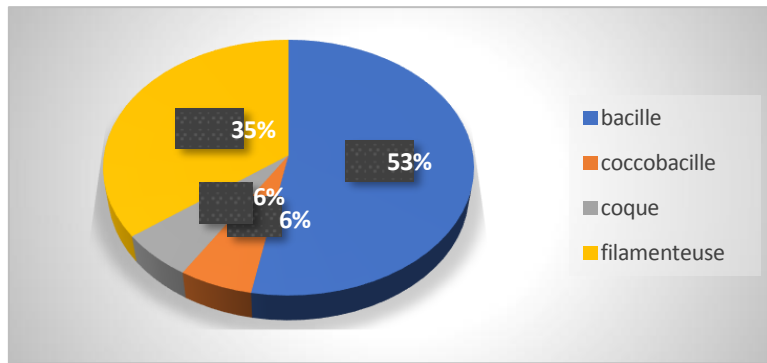


Figure 12- Diagrammes en secteurs présentent les formes cellulaires des souches

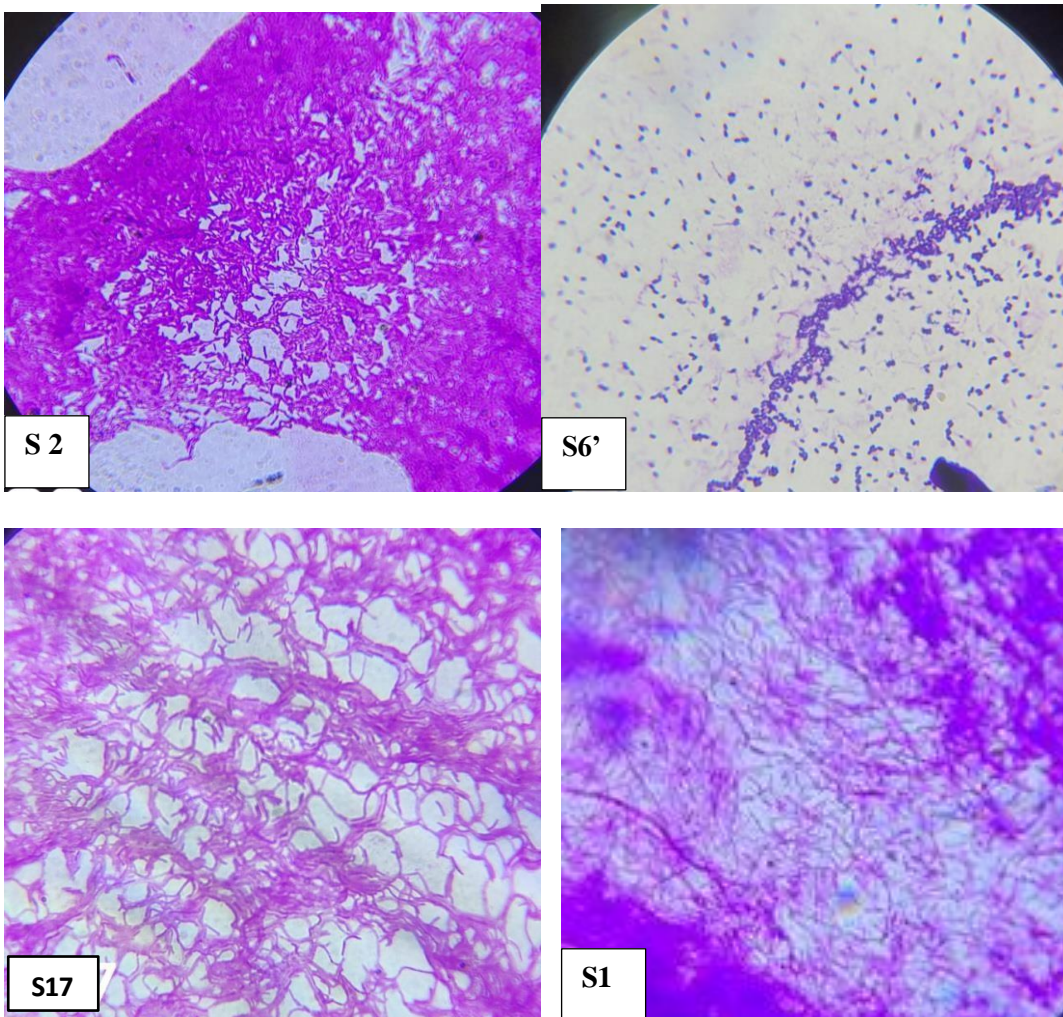


Figure 13- Observation au microscope photonique et à l'immersion (10x100) **S1** : bacille filamenteuse Gram +, **S2** : bacille Gram +, **S6'** : coccobacille Gram +, **S17** : filamenteuse Gram -

Résultats Et Discussion

Les bacilles Gram positif étaient la majorité des bactéries isolées des sources thermales en Algérie, en particulier. LARBI (2015) a mené une étude similaire où 59 souches bactériennes ont été isolées de diverses sources thermales (Hammam Debagh à Galma, Hammam bouhnifia à Mascar, Hammam Bouhjar à Temouchent, Hammam Rabi à Saida). 44 isolats ont été identifiés comme des bacilles Gram positifs, tandis que d'autres ont été identifiés comme des bacilles Gram négatifs et des Cocci Gram positifs.

II.2.2 Caractérisation biochimique des isolats

Les résultats de la caractérisation biochimique des souches étudiées sont représentés dans (annexe 8)

II.2.2.1 Mise en évidence des enzymes respiratoires

L'enzyme oxydase est présente dans 10 souches bactériennes, tandis que les 7 autres souches ne possèdent pas la cytochrome oxydase. 5 souches sont repérées de catalase positive, tandis que 12 souches sont à catalase négative (figure 14. et 15)

La plupart des microorganismes aérobies possèdent au moins un de ces enzymes y compris les bactéries thermophiles

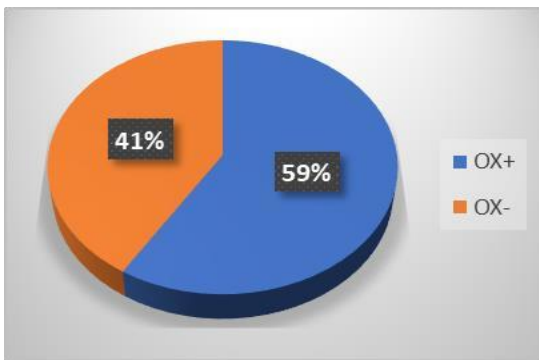


Figure 14- représentation graphique des souches selon le enzymes respiratoire (Ox : Oxydase).

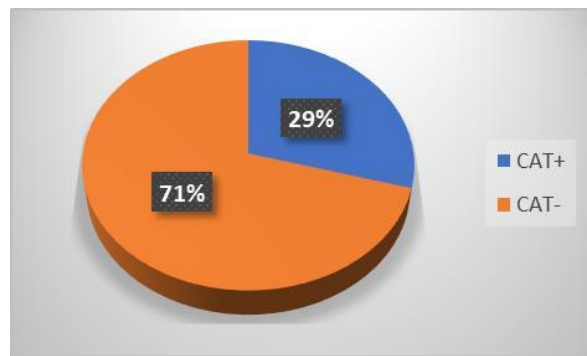


Figure 15.- représentation graphique des souches selon le enzymes respiratoire (Cat : catalase).

II.2.2.2 Test Mannitol-Mobilité

Le test de mannitol est utilisé pour tester la mobilité et la production d'acides et dégagement des gaz par les bactéries. Un résultat positif est noté par un virage de l'indicateur au jaune. (Figure 18)

Le test de la fermentation du mannitol à montrer que 16 souches ont eu la capacité de fermenter le mannitol présentant 94% des souches isolée, alors qu'une seule souche n'a pas fermenté le mannitol. (figure 16)

Concernant la mobilité, 4 souches sont mobiles et 13 souches sont immobiles. (figure 17)

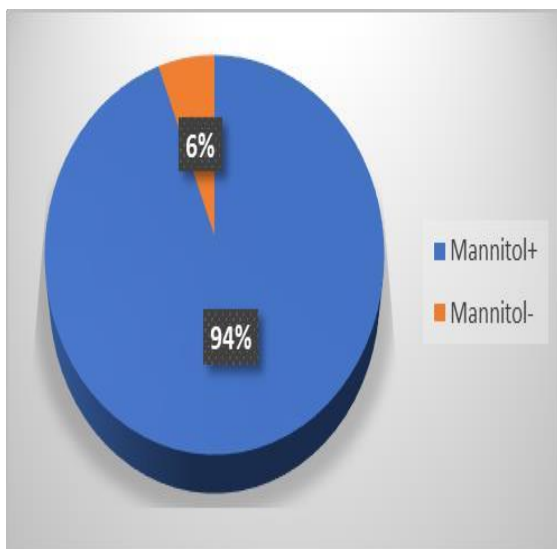


Figure16.- Diagrammes en secteurs présentent la fermentation du mannitol par les souches

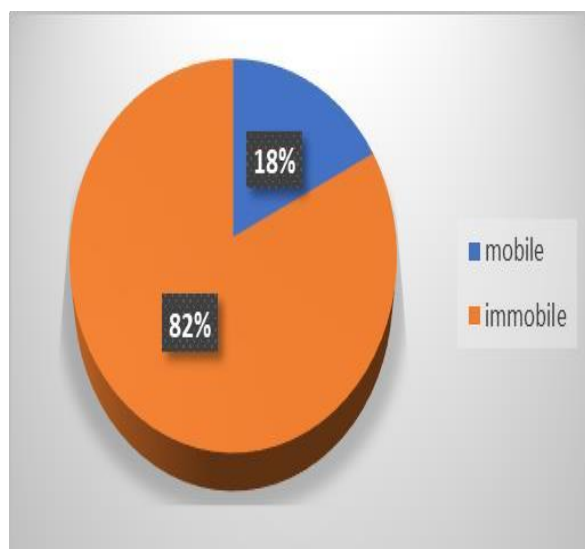


Figure 17- Diagrammes en secteurs présentent la mobilité des souches

Résultats Et Discussion

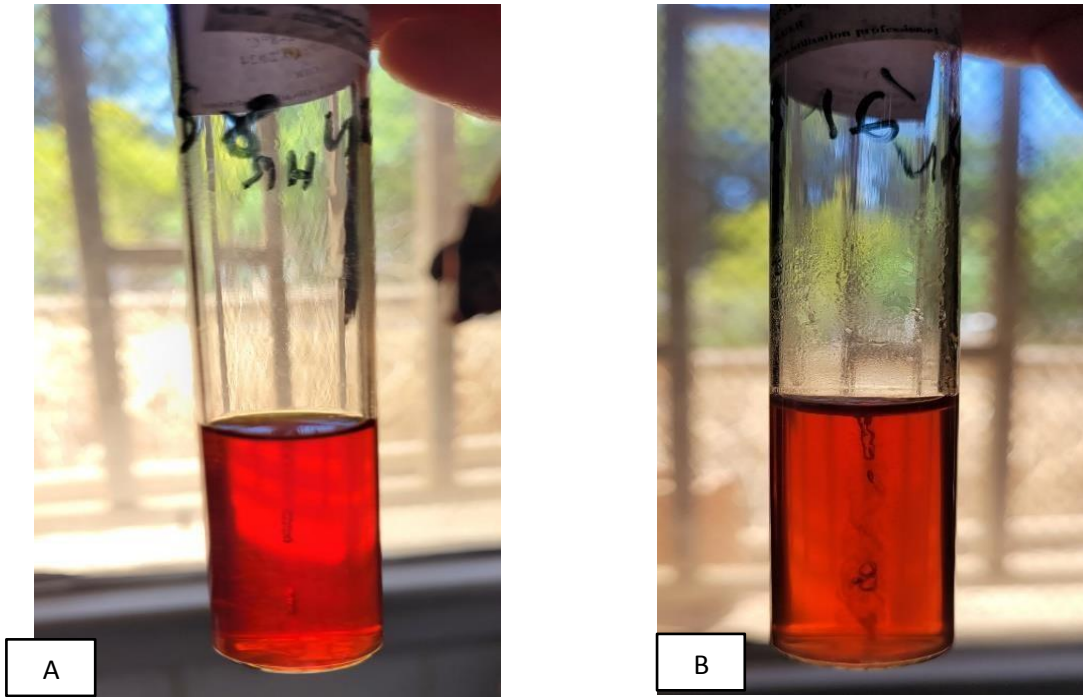


Figure 18 : Test Mannitol-Mobilité , **A** : souche S8 Mannitol + immobile , **B**: souche S16' Mannitol + mobile

II.2.2.3 Galerie Api 20 E

Les résultats de la galerie API 20 E réalisée sur les bactéries thermophiles isolées de la source de Hammam righa sont mentionnés dans (annexe 9) (figure 19,20)

Pour la caractérisation biochimique en utilisant la galerie des API 20E. La majorité des souches ont dégradé la gélatine, tandis qu'un nombre très réduit de souches à une activité positive vis-à-vis l'indole, VP, l'urée, Cit, ODC.

Toutes les souches sont de ONPG, ADH, LDC négative.

Pour l'utilisation des sucres présent sur la plaque, presque toutes les souches ont dégradé le Glucose et le Mannitol, une utilisation très faible de l'Inositol, sorbitol, Rhamnose a été observé par nos isolats thermophile (figurev19)

Aucune souche n'a une activité positive sur l'utilisation d'Arabinose, Melbiose et Amygdaline. Aucune production de H₂S par les souches n'a été constaté. (Figure 19) (annexe 11)

Résultats Et Discussion

L'utilisation des glucides varie entre les souches, on note que les deux souches S8 et S16' qui présentent la plus grande variété de substrats

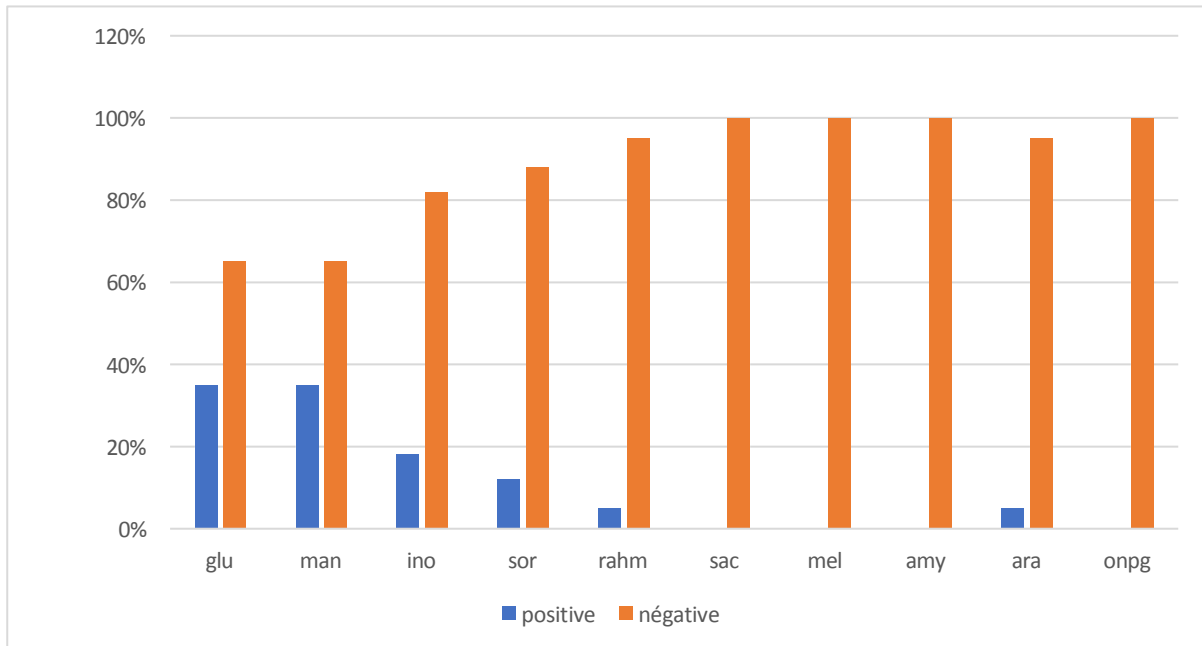


Figure19 : histogramme représente la fermentation des sucres par les isolats

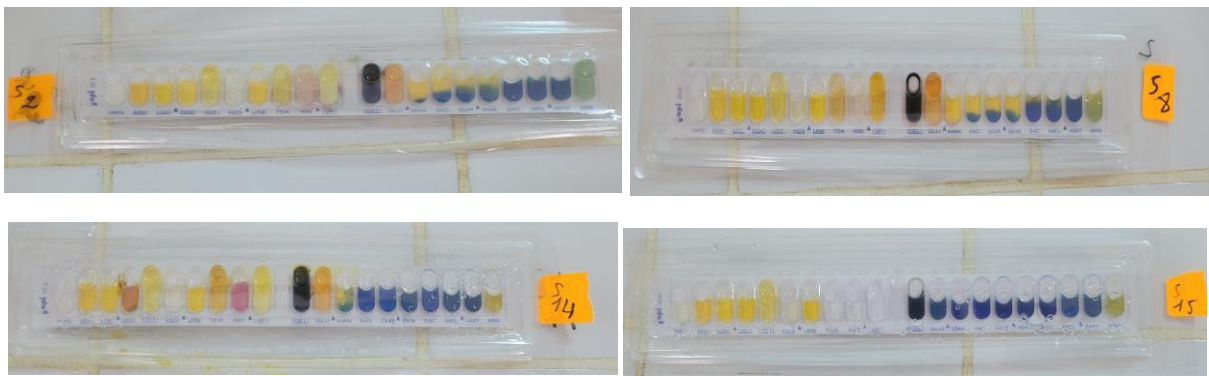


Figure20 : résultats de l'identification biochimiques avec la galerie des Api 20^E

II.2.3 Profils de l'activité hydrolytique extracellulaire

On a réalisé une analyse des activités amylolytiques, protéolytiques et lipolytiques. On a pu identifier la présence de ces activités en utilisant des substrats tels que l'amidon, la caséine, la lécithine, le tween 80 et l'huile d'olive.

Les résultats obtenus après plusieurs essais pour toutes les souches qui ont montré une activité hydrolytique sont présentés dans (annexe 10)

Toutes les souches isolées, ont prouvé une activité hydrolytique, avec une activité minimale

Résultats Et Discussion

d'un plus substrat et maximal de 2 substrat observé chez la souche S18 qui a eu la capacité d'hydrolyser le plus grand nombre de substrat. Aucune souche n'a présenté un résultat positif vis-à-vis tous les polymères testés (figure 21 et 22)

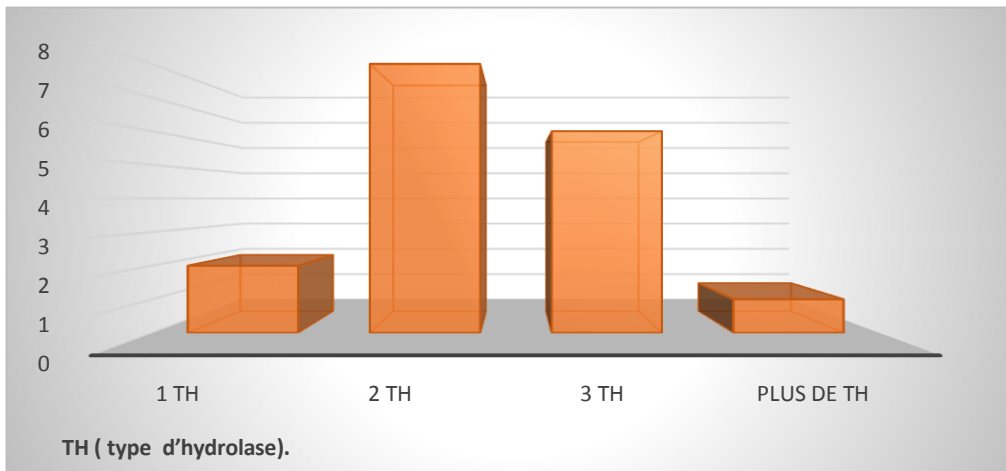


Figure 21.- Répartition des souches étudiées par type et fréquence de production des hydrolases extracellulaires.

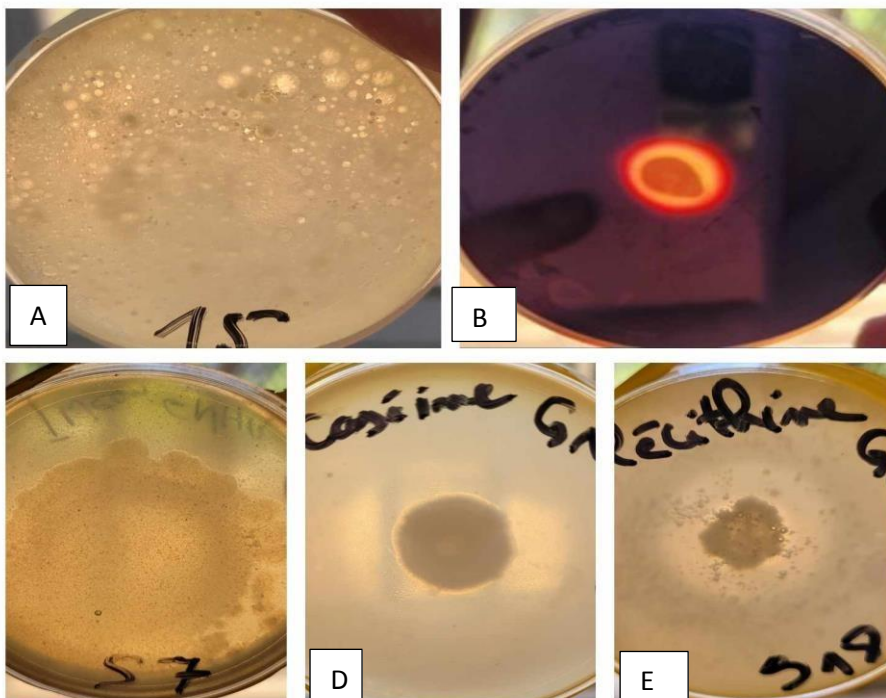


Figure 22 : Exemple d'activités hydrolytiques détectées, A : hydrolyse de l'amidon par la souche 15 , B : hydrolyse de l'amidon , C : hydrolyse de Tween80 par la souche 7, D : hydrolyse de la caséine par la souche 18 , E ; hydrolyse de la lécithine par la souche 18.

Sur le totale de 17 souches hydrolases positifs, l'hydrolyse de l'amidon est importante et est

Résultats Et Discussion

présentée par 13 souches thermophiles, suivi de la caséine qui a présenté une activité relativement élevée présentée par 11 souches, pour l'hydrolyse de l'huile d'olive 08 souches ont prouvé une activité et 06 souches seulement ont hydrolysées le Tween80. L'hydrolyse de la lécithine est présentée par seulement 2 souches, il représente le substrat le plus faiblement hydrolyser. (Figure 23)

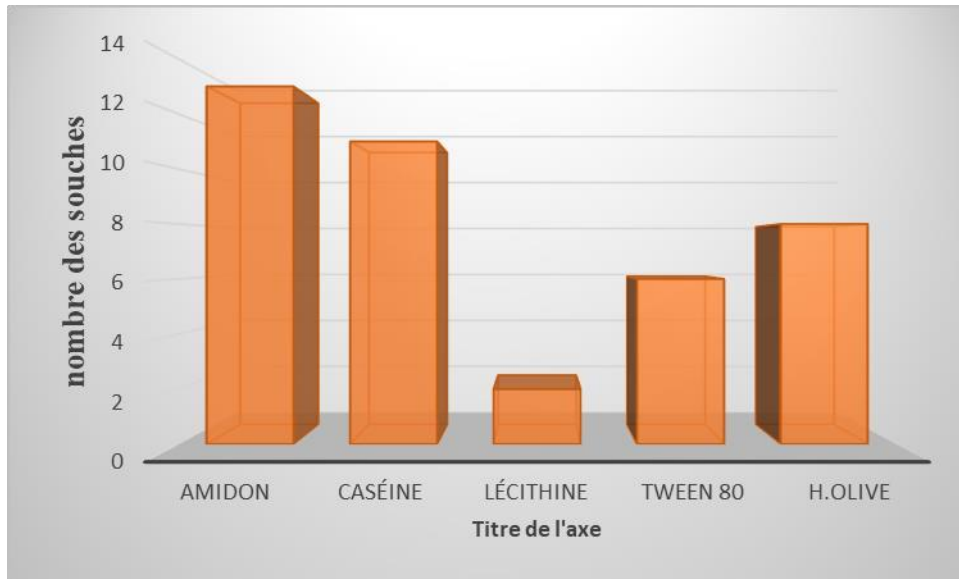


Figure 23 : Effectif des souches ayant pu hydrolysées les polymères tests réparties selon leurs origines d'isolement.

L'un des potentiels importants des micro-organismes thermophiles réside dans leurs activités enzymatiques ; en raison de leur capacité à fonctionner dans des conditions difficiles telles que la température, le pH et la pression, cela augmente leur importance dans les domaines industriels et biotechnologiques (Egorova & Antranikian, 2005). Les applications des enzymes dans les industries sont nombreuses ; par exemple, les hydrolases (amylases, lipases et protéases, etc.) représentent plus de 75 % de toutes les enzymes produites à l'échelle commerciale (Lee et al., 2022).

Les souches bactériennes isolées dans cette étude sont des thermophiles qui ont montré une activité hydrolytique importante en combinaison de plusieurs substrats, Selon (BERTOLDO & ANTRANIKIAN, 2001), les bactéries thermophiles produisent une gamme très développée d'enzymes hydrolytiques (protéase, cellulase, amylase, glucosidase, glucoamylase, pullulanases, cyclodextrine glycosyltransferase).

La totalité des souches (100 %) thermophiles ont produit au moins une hydrolase extracellulaire, L'activité amylolytique était la plus courante dans les isolats avec 13 (35%) des souches, nos résultats sont accord avec (Lee et al., 2022) qui ont noté une activité amylolytique la plus courante avec 65% .

Résultats Et Discussion

En plus de l'activité amylolytique, 11 souches possèdent une activité protéolytique avec une préférence plus notable pour la dégradation de la caséine ce qui est noté dans l'étude de (Mohammad et al., 2017).

D'après nos résultats, nous avons remarqué que nos souches possèdent un bagage enzymatique très développé, la souche S18 est capable d'hydrolyser la majorité des substrats utilisés, donc on peut dire qu'elle possède une activité amylolytique, protéolytique et lipolytique.

Les bactéries thermophiles sont connues comme étant une source très importante d'enzymes. Leur capacité à survivre dans les environnements à haute température fait qu'elles sont généralement dotées d'un bagage enzymatique exceptionnel. De ce fait elles sont exploitées dans de nombreuses industries biotechnologiques pour la production d'enzymes thermostables extracellulaires qui sont actives et stables à des hautes températures (Babavalian et al., 2013).

Conclusion

Et

Perspectives

Conclusion Et Perspectives

Conclusion Et Perspectives

Les extrêmophiles sont des microorganismes qui peuvent être utilisés dans divers secteurs tels que l'agriculture, l'industrie, la pétrochimie, la médecine, l'alimentation et la chimie des sols. Les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles sont très réputés pour leur production d'enzymes thermostables, de produits antimicrobiens et de composés bioactifs dans les domaines de la biotechnologie.

Cette étude vise à isoler et à identifier les bactéries thermophiles qui produisent des thermozyms. La source hydrothermale de Hammam Righa de la wilaya de AIN DEFFLA a été sélectionnée pour cette situation.

Nous avons isolé 17 souches thermophiles en échantillonnant des échantillons d'eau sur deux milieux gélosés spécifiques (GN ; GN + l'eau de source). La plupart des souches étaient des bacilles et des filamenteuses à Gram positif, avec une cytochrome oxydase généralement présente.

Les activités enzymatiques de ces souches ont été évaluées sur sept milieux gélosés contenant différents substrats tels que l'amidon, la lécithine, le tween 80, l'huile d'olive et la caséine, afin de déterminer respectivement leurs activités amylolytique, lipolytique et protéolytique. Les résultats obtenus ont montré que les enzymes extracellulaires de ses souches ont une activité hydrolytique variée, avec une prédominance de l'activité amylolytique.

Effectivement, cette étude a donné lieu à l'exploitation d'un biotope exceptionnel (Hammam Righa). Ce site thermal possède une microflore spécifique qui présente un niveau de température optimal. Il sera possible de mener d'autres études approfondies sur les isolats afin de maximiser leur potentiel, d'améliorer les paramètres de croissance pour une activité enzymatique extracellulaire optimale, et également d'évaluer l'activité antimicrobienne de ces souches par rapport aux souches microbiennes testées.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A:

Aanniz T., Ouadghiri M., Melloul M., Swing J., Elfahim E., Ibijbijben J., IsmailiM., Ammar M. 2015. Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, saltmarshes, and desert soils. *Brazilian journal of microbiology*.

Alain K., Geslin C., Godfroy A. Prieur D. 2010. Les thermophiles [en ligne] https://wwz.ifremer.fr/content/download/12612/file/fiche_big2010_thermophiles Consulté le 3/6/2019

Alain, K. 2003. Approches culturates et moleculaires des assemblages microbiens associates aux polychetes hydrothermaux de la famille Alvinellidae. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale – France

Alber S., Vossenberg J., Driessen A. and Konings W., 2001. Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions, *Extremophiles*.

Al-Johani, N. B., Al-seeni, M. N., Ahmed, Y. M. 2016. Optimization of alkaline α -amylase production by thermophilic *Bacillus subtilis*. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines* .

Allala, F. 2020. Caractérisation d'enzymes thermostables produites par des souches bactériennes d'origine hydrothermale. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene.

Alrumman, S., Yasser, S., Mostafa, M., Al-Qahtani, S., Tarek, H & Taha, T. 2018. Hydrolytic Enzyme Production by Thermophilic Bacteria Isolated from Saudi Hot Springs. *Open Life Sci*

Amarouche-Yala, S., Benouadah, A., el Ouahab Bentabet, A., Moulla, A. S., Ouarezki, S. A., & Azbouche, A. (2015). Physicochemical, bacteriological, and radiochemical characterization of some Algerian thermal spring waters. *Water Quality, Exposure and Health*, 7(2), 233-249. <https://doi.org/10.1007/s12403-014-0130-x>

Antranikian G. 2009. Extremophiles and Biotechnology in: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

Références Bibliographiques

Antranikian, G. 2008. Industrial relevance of thermophiles and their enzymes. *Thermophiles: Biology and technology at High Temperatures*, CRC Press .

Antranikian, G., Vorgias, C.E., Bertoldo, C. 2005. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts., in: *Marine biotechnology I*, Springer .

Antranikian, G., Vorgias, C.E., Bertoldo, C. 2005. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts., in: *Marine biotechnology I*, Springer.

B:

Babavalian, H., Ali, M., Ali, A., Moosazadeh, M., & Shakeri, F. (2013). Isolation and Identification of Moderately Halophilic Bacteria Producing Hydrolytic Enzymes from the Largest Hypersaline Playa in Iran 1. 82(4), 466–474. <https://doi.org/10.1134/S0026261713040176>

Barnabe.,SassevilleR.D., Tyagi et J.R.valero., 2003.Eaux usées et résidus industriels,matières tertiaires premières ? VECTEUR environnement.vol.36.no.2.

BERTOLDO, C., & ANTRANIKIAN, G. (2001). Amylolytic Enzymes from Hyperthermophiles. 330. Egorova, K., & Antranikian, G. (2005). Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Current Opinion in Microbiology*, 8(6), 649–655. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.10.015>

Bhardwaj, K. K., Saun, N. K., & Gupta, R. (2017). Immobilization of lipase from *Geobacillus* sp. and its application in synthesis of methyl salicylate. *Journal of Oleo Science*.

Bok, J.D., Yernool, D.A., Eveleigh, D.E. 1998. Purification, characterization, and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. *Applied and Environmental Microbiology*.

Bouacem, K., Amziane-Touazi, M., Hania, W. B., Cayol, J.-L., Fardeau, M. L., Benayad, T., Hacene, H., & Bouanane-Darenfed, A. (2022). Isolation and characterization of moderately thermophilic aerobic cultivable bacteria from Hammam Righa hot spring (Algeria): Description of their hydrolytic capacities. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*.

Bouacem, K., Bouanane-Darenfed, A., Boucherba, N., Joseph, M., Gagaoua, M., Ben Hania, W., Kecha, M., Benallaoua, S., Hacène, H., Ollivier, B., Fardeau, M. L. (2014).

Références Bibliographiques

Partial characterization of xylanase produced by *Caldicoprobacter algeriensis*, a new thermophilic anaerobic bacterium isolated from an Algerian hot spring. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

Bouacem, K., Laribi-Habchi, H., Mechri, S., Hacene, H., Jaouadi, B., BouananeDarenfed, A. 2018. Biochemical characterization of a novel thermostable chitinase from *Hydrogenophilus hirschii* strain KB- DZ44. *International Journal of Biological Macromolecules*.

Bouanane-Darenfed, A., Fardeau, M.L., Grégoire, P., Joseph, M., KebboucheGana, S., Benayad, T., Hacene, H., Cayol, J.L & Ollivier, B. 2011. *Caldicoprobacter algeriensis* sp. nov. a New Thermophilic Anaerobic, Xylanolytic Bacterium Isolated from an Algerian Hot Spring. *Curr Microbiol*.

Bronnenmeier, K., Kern, A., Liebl, W., Staudenbauer, W.L. 1995. Purification of *Thermotoga*

C:

Calteau, A. 2005. Relations évolutives entre les bactéries et les archées hyperthermophiles. Thèse de doctorat en microbiologie, université de Bretagne occidentale, France.

Casamayor, E.O. 2009. protists, bacteria and fungi: planktonic and attached. Elsevier Inc.

Castelán-Sánchez, H. G., Meza-Rodríguez, P. M., Carrillo, E., Ríos-Vázquez, D. I., LiñanTorres, A., Batista-García, R. A., Pérez-Rueda, E., Rojas-Ruíz, N. E., & Dávila-Ramos, S. (2020). The microbial composition in circumneutral thermal springs from Chignahuapan, Puebla, Mexico reveals the presence of particular sulfur-oxidizing bacterial and viral communities. *Microorganisms*, <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111677>

Chandra, P., Enespa, Singh, R., Arora, P. K. 2020. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial Cell Factories*.

D:

Debnath, T., Kujur, R. R. A., Mitra, R., Das, S. K. 2019. Diversity of microbes in hot springs and their sustainable use. *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological*

Références Bibliographiques

Applications: Volume 1. Microbial Diversity in Normal & Extreme Environments.

E:

Egorova K., Antranikian G.I., Garrett R.A., Klenk H.P., 2007. Archaea: evolution, physiology, and molecular biology, Malden, USA, Blackwell Publishing.

Einarsson, H., B. G. Snygg et C. Eriksson. 1983. Inhibition of bacterial growth by Maillard reaction products. Journal of Agricultural and Food Chemistry.

Einarsson, H., B. G. Snygg et C. Eriksson: 1983 Inhibition of Bacterial Growth by Maillard Reaction Products Journal of Agricultural and Food Chemistry .

F:

Ferrera I., Reysenbach A L. 2007. Thermophiles in: Encyclopedia of life

G:

Gargaud, M. (2005). L'environnement de la terre primitive. Presses Univ de Bordeaux

Gomri, M.A. 2012. Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermales terrestres de l'Est algérien. Mémoire de Magister en Sciences Alimentaires, Université MENTOURI-CONSTANTINE.

Gregoire P., Fardeau M.L., Guasco S., Bouanane A., Michotey V., Bonin P., Dubourg K., Cambar J., Ollivier B. 2009. Les micro-organismes de l'extrême. Press Therm Climat.

Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry .

Références Bibliographiques

H:

Haki , G. , Rakshit , S. 2003. Developments in industriatly important thermostable enzymes : a review . Bioresource Technology ,

Horikoshi K. 1999. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews.

Horikoshi, K & Bull, A.T. (2011). Prologue Definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emergingfields of extremophiles In Extremophiles Handboo. Eds. Springer.

Hupé, J.P. 2008. Enrichissement et recherche de certaines, activités enzymatiques produites par des bactéries aérobies themophiles. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maitre ès Science (M Sc.) en Microbiologie appliquée Umiversité du Québee, Canada.

Hussein, E. I., Jacob, J. H., Shakhatreh, M. A. K., Abd Al-razaq, M. A., Juhmani, A. F., & Cornelison, C. T. (2017). Exploring the microbial diversity in Jordanian hot springs by comparative metagenomic analysis. MicrobiologyOpen, <https://doi.org/10.1002/mbo3.521>

I:

Irwin J. A., Baird A. W. 2004. Extremophiles and their application to veterinary medicine. Irish Veterinary Journal. Volume .

K:

Kecha, M., Benallaoua, S., Touzel, J.P., Bonaly, R & Duchiron. F. (2007).Biochemical and phylogenetic characterization of a novel terrestrial hyperthermophilic archaeon pertaining to the genus Pyrococcus from an Algerian hydrothermal hot spring. Extremophiles.

Kim, K.W & Lee, S.B. 2003. Inhibitory Effect of Maillard Reaction Products on Growth of the

Références Bibliographiques

Aerobic Marine Hyperthermophilic Archaeon Aeropyrum pernix. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.

Kirk O.T.V., Borchert et C.C .,FUGLSANG.,2002.Industrial enzyme applications .Current Opinion in Biotechnology.

Kumar.S., Dangi. A.K.,Shukla, P.,Baishya.D & Khare .S.k. 2019.Thermozymes: Adaptive strategies and tools for their biotechnological applications.Bioresource Technology.

Kumar.S., Dangi. A.K.,Shukla, P.,Baishya.D & Khare .S.k. 2019.Thermozymes: Adaptive strategies and tools for their biotechnological applications.Bioresource Technology.

L :

Lalmanach, G. 2008. Proteolytic enzymes: from structures to transporpathways. Biochimie.

Lee, Y., Ganbat, D., Oh, D., Kim, H., Jeong, G. E., Cha, I., Kim, S., Nam, G., Jung, Y., & Lee, S. (2022). Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Hot Springs in Republic of Korea. .

Levisson M.J et al., 2009. Extremophiles .

Lewinson O., Padan E. and Bibi E. 2004. Alkalitolerance: A biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis. P.N.A.S.

Li, M. F., Yang, S., Sun, R. C. 2016. Recent advances in alcohol and organic acid fractionation of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology.

M:

Macelroy, R. D. Some comments on the evolution of extremophiles. Biosystems, 1974. [[https://doi.org/10.1016/0303-2647\(74\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0303-2647(74)90026-4)]

Madigan M. T. and Martino J. M. 2006. Brock Biology of Microorganisms, 11th ed.; Pearson Education: Upper Saddle River, N. J., USA.

Références Bibliographiques

Madigan M., Martinco J. 2007. Biologie des micro-organismes. 11ème éd. Paris : Pearson éducation France.1047p. *maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials. Applied and Environmental Microbiology.

Mathis B.J et al.,2008. Electricity generation by thermophilic microorganisms from marine sediment. Appl. Microbiol. Biotechnol.

Mechri, S., Bouacem, K., Allala, F., Khaled, M., Bouanane-darenfed, A., Hocine, H., & Jaouadi, B. (2021). Preliminary screening and characterization of novel proteolytic enzymes produced by extremophilic bacteria isolated from Tunisian and Algerian biotopes. Revue Nature et Technologie.

Minic, Z., Serre, V & Hervé, G. 2006. Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes.Comptes rendus biologies.

Mohammad, B.T., Al Daghistani, H.I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S. & Kennes, C. (2017). Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. International Journal of Microbiology.

Morozkina E. V., Slutskaya E. S., Fedorova T. V., Tugay T. I., Golubeva L. I. and Koroleva O. V. 2010. Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application. Appl. Biochem. Microbiol.

N:

Nakagawa T., Ishibashi J., Maruyama A., Yamanaka T., Morimoto Y., Kimura H., Urabe T. and Fukui M. 2004. Analysis of dissimilatory sulfite reductase and 16S rRNA gene fragments from deep-sea hydrothermal sites of the Suiyo Seamount, IzuBonin Arc, Western Pacific, Appl. Environ. Microbiol.

O :

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

P :

Palud A et al., 2008. Mol Microbiol .

Panda, M.K., Sahu, M.K & Tayung, K. 2013. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. With protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. IRANIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY.

Panda, M.K., Sahu, M.K & Tayung, K. 2013. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. With protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. IRANIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY.

Pandey, A., Dhakar, K., Sharma, A., Priti, P., Sati, P., & Kumar, B. (2015). Thermophilic bacteria that tolerate a wide temperature and pH range colonize the Soldhar (95°C) and Ringigad (80°C) hot springs of Uttarakhand, India. Annals of Microbiology. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0921-0>

Park, C. B., S. B. Lee et D. D. Ryu. 2001. L- pyroglutamate spontaneously formed from L- glutamate inhibits growth of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Applied and Environmental microbiology.

Patrick Forterre., 2007. Microbes de l'enfer, Éd. Belin, Pour la science.

Podar M. and Reysenbach A. L. 2006. New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. Current Opinion in Biotechnology.

Potprommanee, L., Wang, X., Han, Y., Nyobe, D., Peng, Y., Huang, Q., Liu, J., Liao, Y., Chang, K. 2017. Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass. PLoS one.

Prakash O., Jaiswal N. 2010. α -Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. Appl Biochem Biotechnol.

Q:

Querellou J., Guezennec J. 2010. Biotechnologie des extrémophiles. Editions Tech. Ing.

R:

Rabbani, M., Bagherinejad, M. R., Sadeghi, H., Shariat, Z. S., Etemadifar, Z., Moazen, F., Rahbari, M., Mafakher, L., Zaghian, S. 2013. Isolation and characterization of novel thermophilic lipase- secreting bacteria. Brazilian Journal of Microbiology.

Rawlings D.E., Johnson D.B., 2007 .Microbiol .

Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., Gautieri, A. 2018. Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. APL Bioengineering

Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., Gautieri, A. 2018. Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. APL Bioengineering.

Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., Gautieri, A. 2018. Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. APL Bioengineering.

S:

Saeed, A. M., El-Shatoury, E. H., Sayed, H. A. 2021. Statistical factorial designs for optimum production of thermostable α -amylase by the degradative bacterium *Parageobacillus thermoglucosidasius* Pharon1 isolated from Sinai, Egypt. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.

Saghatelyan, A., Margaryan, A., Panosyan, H., & Birkeland, N.-K. (2021). Microbial diversity of terrestrial geothermal springs in Armenia and Nagorno-Karabakh: A Review. Microorganisms, <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071473>

Références Bibliographiques

Sahoo, K., Sahoo, R. K., Gaur, M., Subudhi, E. 2020. Cellulolytic thermophilic microorganisms in white biotechnology: a review. *Folia Microbiologica*, .

Saibi, H. 2009. Geothermal resources in Algeria. *Renew Sustain Energy* .

Saibi, H. 2015. Geothermal resources in Algeria. *Proceedings in World Geothermal Congress 2015*, Melbourne, Australia, 19–24 April.

Sarethy I. P., Saxena Y., Kapoor A., Sharma M., Sharma S. K., Gupta V. and Gupta S. 2011. Alkaliphilic bacteria : applications in industrial biotechnology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*.

Satyanarayana, T., Littlechild, J., & Kawarabayasi, Y. (Éds.). (2013). Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5899-5>

SÜRÜCÜ, G. 1999. Growth requirements of thermophilic aerobic microorganisms in mixed cultures for the treatment of strong wastes *Water Science and Technology*.

T:

Te'o, V., Saul, D., Bergquist, P. 1995. celA, another gene coding for a multidomain cellulase from the extreme thermophile *Caldocellum saccharolyticum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* ,43(2), 291- 296. *Thermophiles, biology and technology at high temperatures*. Ed. Robb F., Antranikian G., Grogan D., Driessen A.. CRC Press, New York.

V:

Verma, S., Meghwanshi, G. K., Kumar, R. 2021. Current perspectives for microbial lipases from extremophiles and metagenomics. *Biochimie*, .

W:

Williams YJ et al., 2009 .*Appl Environ Microbiol* .

Z:

Zarafeta, D., Kissas, D., Sayer, C., Gudbergdottir, S.R., Ladoukakis, E., Isupov, M.N., Chatziioannou, A., Peng, X., Littlechild, J.A., Skretas, G. 2016. Discovery and characterization of a thermostable and highly halotolerant GH5 cellulase from an Icelandic hot spring isolate. PloS One.

Annexes

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Préparation des milieux

- **Gélose nutritif (GN)**

Nutrient agar.....28 mg L'eau
distillé.....1L

- **Gélose nutritive à base de l'eau de source (GNhr)**

Nutrient agar.....28 mg
Eau de source.....1 L

- **Bouillon nutritif (BN)**

Nutrient Broth.....8g L'eau
distillé.....1L

- **Bouillon nutritif à base de l'eau de source (BNhr)**

Nutrient Broth.....8g
Eau de source.....1 L

- **Tween 80**

GN.....14 g
L'eau distillé.....500 ml
Tween.....5 ml

- **Tween 80 à base de l'eau de source**

GN.....14 g
Eau de source.....500 ml

Annexes

Tween.....5 ml

- **Amidon**

GN.....14g

L'eau distillé.....500 ml

Amidon.....5g

- **Amidon à base de l'eau de source**

GN.....14g

Eau de source.....500 ml

Amidon.....5g

Annexe 2 : coloration de Gram

- **Réactifs**

- Violet de gentiane
- Lugol de Gram
- Alcool
- Fuschine de ziehl

- **Préparation du Frottis**

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

Annexe 3 : Test de Catalase

- **Technique**
 - Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur
 - Prélever une colonie à l'aide de l'anse.
 - Dissocier la colonie dans la goutte.
 - Observer immédiatement
- **Lecture**
 - Catalase positive : dégagement immédiat de bulles de gaz.
 - Catalase négative : absence de dégagement de bulles de gaz.

Annexe 4 : Test d'oxydase

- **Technique**
 - Placer un disque non imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée.
 - Déposer une goutte de réactif sur le disque non imprégné.
 - Avec une pipette Pasteur prélever une colonie et la déposer doucement sur le disque.
- **Lecture**
 - Oxydase positive : virage de couleur rose-rouge.
 - Oxydase négative : absence de couleur.

Annexe 5 : Milieux pour les tests enzymatiques

- **Cacéine 1 %**

GN.....200 ml

Lait.....2 ml

GNhr.....150 ml

Lait.....1,5 ml

- **Lécithine 10 %**

Jaune d'œuf.....35ml

L'eau physiologie stérile.....35ml

GN.....50ml

Jaune d'œuf+ L'eau physiologie stérile.....5ml

GNhr.....50ml

Jaune d'œuf+ L'eau physiologie stérile.....5ml

- **Test de l'huile d'olive**

GN.....50ml

l'huile d'olive.....0,5ml

GNhr.....100ml

l'huile d'olive.....1ml

Annexes

Annexe 6- Les caractères cultureux des souches

| Souche | Aspect | Couleur |
|--------|----------|-------------|
| S1 | Rugueuse | Crémeuse |
| S2 | Rugueuse | Crémeuse |
| S3 | Rugueuse | Jaunâtre |
| S4 | Lisse | Translucide |
| S5 | Rugueuse | Jaunâtre |
| S6 | Lisse | Blanchâtre |
| S6' | Lisse | Jaunâtre |
| S7 | Rugueuse | Jaunâtre |
| S8 | Rugueuse | Crémeuse |
| S8' | Rugueuse | Blanchâtre |
| S8'' | Rugueuse | Translucide |
| S14 | Rugueuse | Blanchâtre |
| S15 | Rugueuse | Translucide |
| S16 | Lisse | Translucide |
| S16' | Lisse | Translucide |
| S17 | Lisse | Translucide |
| S18 | Lisse | Translucide |

Annexes

Annexe 7- Les caractères morphologiques des souches

| Souche | Forme | Gram |
|--------|----------------------|------|
| S1 | Bacille filamenteuse | + |
| S2 | Bacille | + |
| S3 | coque | + |
| S4 | Bacille | + |
| S5 | Bacille | + |
| S6 | Bacille | + |
| S6' | coccobacille | + |
| S7 | Bacille | - |
| S8 | filamenteuse | - |
| S8' | Bacille | - |
| S8'' | Bacille | + |
| S14 | filamenteuse | + |
| S15 | filamenteuse | + |
| S16 | filamenteuse | + |
| S16' | filamenteuse | - |
| S17 | filamenteuse | - |
| S18 | Bacille | + |

Annexes

Annexe 8- Caractérisation biochimiques des souches

| Souche | Ox | Cat | Man | Mob | CIT | H2S | ADH | ODC |
|--------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| S1 | - | + | + | - | - | - | - | - |
| S2 | + | + | + | - | - | - | - | - |
| S3 | + | - | + | + | - | - | - | - |
| S4 | + | - | + | - | - | - | - | - |
| S5 | - | - | + | - | -- | - | - | - |
| S6 | + | - | + | - | - | - | - | - |
| S6' | - | - | + | - | - | - | - | - |
| S7 | + | + | + | + | - | - | - | - |
| S8 | - | - | + | - | - | - | - | - |
| S8' | + | + | - | - | - | - | - | - |
| S8'' | - | - | + | - | - | - | - | - |
| S14 | - | + | + | + | - | - | - | + |
| S15 | + | + | + | - | - | - | - | - |
| S16 | + | - | + | - | - | - | - | - |
| S16' | - | - | + | + | - | - | - | - |
| S17 | + | - | + | - | - | - | - | - |
| S18 | + | - | + | - | | | | - |

+ : résultat positif, - : résultat négatif, Ox : Oxydase. Cat : Catalase. Mob : Mobilité.
Man : Mannitol

Annexes

Annexe 09 : Caractérisation biochimiques des souches bactériennes par la galerie Api 20^E

| souche | O N P G | A D H | L D C | O D C | CIT | H 2 S | URE | T D A | IND | V P | GEL | G L U | M A N | INO | SOR | RHA | SAC | M E L | A M Y | A R A | Ox | |
|--------|------------------|-------------|-------------|-------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|--------|-----|-------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-------------|-------------|-------------|----|---|
| S1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S2 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| S3 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| S4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| S5 | - | - | - | - | -- | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| s6' | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S7 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + |
| S8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + |
| S8' | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| s8'' | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S14 | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S15 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| S16 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| s16' | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| S17 | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| S18 | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |

Annexes

Annexe 10- Activité hydrolytiques des souches

| Souche | Ami | Cas | Léc | Tw80 | HO |
|--------|-----|-----|-----|------|----|
| S1 | + | + | - | - | - |
| S2 | + | + | - | - | - |
| S3 | - | - | - | + | - |
| S4 | - | - | - | + | - |
| S5 | - | + | - | + | - |
| S6 | - | - | - | + | + |
| S6' | + | - | - | - | + |
| S7 | + | | - | + | - |
| S8 | + | - | - | + | + |
| S8' | + | + | - | - | + |
| S8'' | + | + | - | - | + |
| S14 | + | + | - | - | + |
| S15 | + | + | - | - | + |
| S16 | + | + | - | - | - |
| S16' | + | + | + | - | - |
| S17 | + | + | - | - | - |
| S18 | + | + | + | - | + |

+ : réaction positive, - : réaction négative. Ami : hydrolyse de l'amidon. Cas : hydrolyse de la caséine. Tw80 : hydrolyse du tween 80. Léc : hydrolyse de la lécithine . HO : hydrolyse de l' Huile d'olive .

Annexes

Annexe 11: Fermentation des sucres par les isolats

| Souche | Glu | Man | Ino | Sor | Rahm | Sac | Mel | Amy | Ara | Onpg |
|--------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|
| S1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S4 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| S5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S6 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S6' | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S7 | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| S8 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| S8' | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S8'' | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S14 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S15 | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S16 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S16' | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| S17 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S18 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Annexes

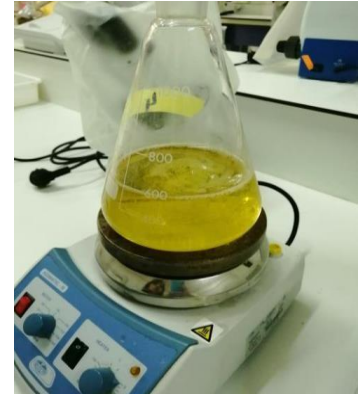
Annexe 12 : Appareillage



Vortex



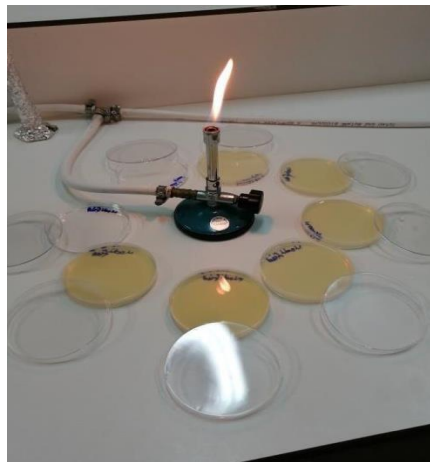
Micropipette



Agitateur



Balance



Bec bunsen



Microscope Optique



Autoclave (stérilisateur)



Etuve



Bain mari