

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Ibn Khaldoun–Tiaret  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique  
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie (D04)  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

**BAGHDAD Khaldia.**

**BENSADEK Fatiha**

**HOCINI Siham**

Thème

# SCREENING DES SOUCHES THERMOPHILES DE DIFFERENTS BIOTOPES ECOLOGIQUES

Soutenu publiquement le 29/06/2019

Jury:		Grade
Présidente:	Mme. OMAR Y.	MCA
Encadreur:	Mme. ABDI F. Z.	
Examineur :	Mme. BOUBAKEUR B.	MCB

Année universitaire 2018-2019

## ***Remerciement***

*En tout premier lieu nous tenons à remercier «Allah» qui nous a donné la force la volonté et le courage pour pouvoir terminer ce travail*

*On tient à remercier notre chère promotrice **Mme ABDI F.Z.** pour son encadrement, ses conseils et ses encouragements.*

*Nous tenons aussi à exprimer nôtres vifs remerciements à :*

***Mme OMARI Y.** et **Mme BOUBAKEUR B.** de nous avoir fait l'honneur de jugées notre travail. Qu'elles trouvent ici l'expression de notre profonde gratitude.*

*Nos vifs remerciements s'adressent au corps des enseignants de sciences de la nature et de la vie, pour le soutien et les conseils avisés qu'ils ont su nous donner tout au long de notre formation de master et spécialement **Mr HOUICINE L.** le chef de notre spécialité. Veuillez trouver ici le témoignage de nos sincères reconnaissances et de notre profond respect.*

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer ma gratitude et mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce mémoire.*

# Sommaire

Introduction générale .....	01
-----------------------------	----

## *Partie Bibliographique*

I- NOTIONS D'EXTREMOPHILES.....	03
I.1- Définition .....	03
I.2- Les conditions des environnements extrêmes .....	03
I.3- Catégories des extrémophiles.....	03
I.4- Intérêt biotechnologique des extrémophiles.....	04
II-THERMOPHILES.....	05
II-1-Définition .....	05
II-2-Classification des thermophiles .....	05
II-3-Intérêt biotechnologiques des thermophiles .....	05
II.4-Niches écologiques des thermopiles .....	06
II.4.1-Biotopes naturels .....	06
II.4.2-Biotopes artificiels .....	06

## *Partie Expérimentale*

### *Chapitre I. Matériels et Méthodes*

I.1- Objectifs du travail .....	08
I.2- Lieu de travail .....	09
I.3-Présentation du site de prélèvement.....	09
I.4- Echantillonnage .....	10
I.5- Isolement et purification des isolats	
I .6- Identification des souches purifiées.....	11
I .6.1-Caractérisations culturale et morphologique des souches.....	12
I.6.1.1- Aspect macroscopique .....	12
I.6.1.2- Aspect microscopique .....	12
I.6.2- Caractérisation physiologique .....	12
I.6.2.1- Influence de la Température .....	12
I.6.2.2- Influence de la concentration en NaCl .....	12
I.6.2.3 -Effet du pH.....	12
I.6.3- Caractérisation biochimique .....	13
I.6.3.1-Recherche de la catalase .....	13
I.6.3.2- Type respiratoire VF .....	13

I.6.3.3- Mannitol mobilité.....	14
I.6.3.4- Utilisation des sucres TSI .....	14
I.6.3.5-Utilisation de citrate .....	15
I.6.3.6- Utilisation des substrats carbonés .....	15
I.6.3.7-Recherche de $\beta$ - galactosidase .....	16
I.6.3.8-Production de l'uréase .....	17
I.6.3.9- Tests ODC, LDC, ADH .....	17
I.6.3.10-Test urée-indole.....	18
I.6.3.11-Caractérisation de type fermentaire (Clarck et lubs):.....	19
I.7- Recherche de l'activité hydrolytique .....	20
I.7.1- Détermination de l'activité amylolytique .....	20
I.7.2-Détermination de l'activité protéolytique .....	20
I.7.2.1-Hydrolyse de la caséine.....	20
I.7.2.2-Hydrolyse de la gélatine.....	20
I.7.3-Détermination de l'activité lipolytique .....	20
I.8- Screening primaire de l'activité antimicrobienne.....	21
I.8.1-Technique des stries croisées (Cross streak) .....	21

## *Chapitre II. Résultats et discussion*

II.1-Isolement et purification des isolats .....	24
II.2-Identification des souches purifiées.....	24
II.2.1- Caractérisations culturale et cellulaire des isolats .....	24
II.2.1.1- Aspect macroscopique .....	25
II.2.1.2 Aspect microscopique .....	25
II.2.2-Caractérisation physiologique des isolats .....	28
II.2.2.1-Température de croissance .....	28
II.2.2.2- Influence de la concentration en NaCl .....	29
II.2.2.3- Influence de pH.....	30
II.2.3. Caractérisation biochimiques des isolats .....	32
II.2.3.1- Recherche de catalase .....	33
II.2.3.2- Mise en évidence du type respiratoire .....	33
II.2.3.3-Utilisation des substrats carbonés.....	33
II.2.3.4-Test Mannitol-Mobilité.....	33
II.2.3.5- Utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron .....	34
II.2.3.6- L'utilisation du Citrate de Simmon .....	34

II.2.3.7- Recherche de la $\beta$ -galactosidase .....	34
II.2.3.8- Recherche de l'uréase .....	34
II.2.3.9- Production de décarboxylases (LDC, ODC) et Arginine dihydrolase (ADH) .....	34
II.2.3.10- Caractérisation du type fermentaire (RM-VP).....	34
II.2.3.11-Test urée- indole .....	35
II.3-Profil des activités hydrolytiques extracellulaires des souches isolées .....	37
II.4-Activité antimicrobienne .....	41
II .5- Identification des isolats .....	42
Conclusion .....	45
Références bibliographiques	
Annexes	

## LISTE DES ABREVIATIONS

**% p/v** : pourcentage poids-volume.

**% v/v** : pourcentage volume –volume.

**μ aer** : Micro-aérophile.

**ADH** : Arginine-Dihydrolase.

**Aer ana** : Aero-anaerobie facultatif.

**Ami** : amidon.

**Arb** : Arborisant

**ATCC** : American Type Culture Collection.

**Bb** : souche de boue de Hammam Bouhanifia.

**BE** : souche de l'eau de source de Hammam Bouhanifia.

**Bou** : Bouclée

**BS** : souche de sédiment de Hammam Bouhanifia

**C** : Crémeuse.

**Cas** : Caséine.

**Cat** : Catalase

**Cir** : Circulaire.

**Cou** : Cotonnée

**Den** : Dentelée

**F** : faible.

**Fil** : Filamenteux

**Gal** : Galactose.

**Gél** : Gélatine.

**GLU** : glucose.

**H2S** : Sulfure d'Hydrogène.

**Ind** : indole.

**IR** : Irrégulière

**L** : Colonie de type lisse

**Lac** : lactose.

**LDC** : Lysine decarboxylase.

**M** : Colonie de type muqueux,

**M1** : Milieu M1

**Mal** : maltose.

**Man** : mannitol.

**Mob** : mobilité.

**N.d** : Non Déterminé.

**ODC** : Ornithine decarboxylase.

**Ond** : Ondulée

**ONPG** : Ortho-nitrophényl- $\beta$ -galactoside.

**Op** : Opaque

**Op\***: le centre de colonie est opaque

**P** : partielle.

**R** : Colonie de type rugueux

**Rhz** : Rhizoïde

**S** : Colonie de type sèche,

**SAC** : saccharose.

**ST** : citrate de simmon.

**Tc** : Translucide

**Tc\*\*** : Translucide à transparent.

**Tc\***: Translucide à opaque.

**TP** : Transparent

**TSI** : Triple Sugar Iron.

**TW** : Tween.

**VF** : viande foie.

**VP** : Voges-Proskauer.

**Xyl** : xylose.

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Caractérisation morphologiques des isolats .....	26
Tableau 2 : Caractères physiologique (Salinité, température et pH) de croissance des souches.....	31
Tableau 3 : Caractérisation biochimiques des isolats .....	35
Tableau 4 : Utilisation des substrats carbonés par les isolats .....	36
Tableau 5 : Activité hydrolytiques des souches isolées. ....	38
Tableau 6 : Résultats de l'activité antimicrobienne de dix isolats vis-à-vis les souches tests .....	41
Tableau 7 : Tableau identification des isolats selon Bergy's manuel.....	43



## LISTE DES FIGURES

---

Figure 1. Terminologie des extrêmophiles en fonction de la température et du pH .....	04
Figure 2. Photographie de différents environnements extrêmes. (Gregoire, 2009).....	07
Figure 3. Diagramme de protocole expérimental. ....	08
Figure 4. Localisation de la zone d'étude (Boughalali,2003).....	09
Figure 5. Sites des prélèvements des échantillons d'eau, boue et de sédiment. ....	10
Figure 6. Aspects macroscopique des souches .....	25
Figure 7 : Observation au microscope photonique à l'immersion (X100). ....	26
Figure 8. Résultats de l'influence de la Température 65° C sur la croissance des Isolats.....	29
Figure 9. Résultats de l'influence de NaCl sur la croissance des souches isolées.....	30
Figure 10. Résultats de l'influence de pH sur la croissance des isolats .....	31
Figure 11. Résultat positif de test catalase .....	33
Figure 12. Exemples d'activités hydrolytiques détectées.....	37
Figure 13. Pourcentage des souches possédant une activité lipolitique .....	39
Figure 14. Pourcentage des souches possédant une activité amylolytique.....	39
Figure 15. Pourcentage des souches possédant une activité protéolytique .....	39
Figure 16. Effectifs des souches ayant pu hydrolysées les substrats tests, répartis selon leurs différents niches d'isolement. ....	40
Figure 17. Résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis E. coli, S. aureus et Candida albicans .	42

# *Introduction*

### INTRODUCTION

Il existe peu d'endroits stériles sur la planète : déserts glaciaires, sources chaudes, fonds océaniques, milieux hyper salés, roches du manteau terrestre... même ces environnements hostiles abritent une riche biodiversité de microbes dits extrémophiles (Franzetti, 2019).

Dans ce sens, Les organismes vivants en milieux extrêmes et en particulier les micro-organismes ont, au cours de l'évolution, développés des stratégies adaptatives très variées pour maintenir l'intégrité de leur machinerie cellulaire à des conditions de température, pression ou salinité mortelles pour toute autre forme de vie (Alber *et al.*, 2001).

La vie à des températures élevées est classée en forme thermophile ou hyperthermophile. Les thermophiles, sont des organismes vivants à des températures optimales de croissance comprises entre 50 et 80°C ; elle sont particulièrement attirés l'attention des chercheurs, car ils constituent potentiellement un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales comme les enzymes thermostables qui présentent des caractéristiques uniques et peuvent convenir à la réalisation des processus biotechnologiques propres et durables à des températures élevées (Bhalla *et al.*, 2011).

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

L'Algérie est l'un des pays riches en ressources géothermique et surtout les sources chaudes, exploitées pour leurs bienfaits, notamment thérapeutiques. Cependant, ces sources n'ont été que très peu étudiées d'un point de vue biodiversité, mais nous pouvons citer les travaux de l'équipe Bouanane *et al.* (2011), qui a isolé une nouvelle bactérie : (*I'aldicoproharter algeriensis* appartient à l'ordre des Clostridiales et la famille des Caldicoprobacteraceae de la source hydrothermale de Guelma (Algérie) (Kecha *et al.*, 2007 ; Bouanane *et al.*, 2011).

Vue le manque de données mettant en évidence la richesse de ces biotopes en micro-organismes, nous avons été amenés à réaliser un screening des souches thermophiles à partir d'eau, boue et sédiment de la source thermale de Hammam Bouhanifia. L'intérêt de ce criblage des souches est de fournir des connaissances en mieux sur la biodiversité bactérienne de ces niches écologiques. Sur ceci, notre travail permet de pallier à l'insuffisance de ces données d'une part, et déterminer le pouvoir enzymatique et antimicrobien de ces souches pour les exploiter dans les domaines de la biotechnologie dans le futur.

## INTRODUCTION

---

Pour atteindre ces objectifs l'étude est subdivisée en deux parties :

- Une première partie bibliographique, regroupe, les conceptions théoriques de bases relatives à notre thème.
- Une deuxième partie expérimentale, comprenant :
  - Un chapitre porte l'ensemble des matériels et des méthodes utilisés pour l'isolement, l'identification et la caractérisation des bactéries thermophiles, ainsi la détermination de leurs activités hydrolytiques et leur pouvoir antimicrobien.
  - Le deuxième chapitre qui, s'intéresse à la discussion des résultats obtenus, ainsi que leur interprétation, et enfin une conclusion générale tout en présentant quelques perspectives pour la présente étude.

# *Partie Bibliographique*

## I- NOTIONS D'EXTREMOPHILES

### I.1- Définition

Les extrêmophiles sont des micro-organismes qui peuvent développer de manière optimale dans des zones écologiques avec des conditions physiques et chimiques mortelles pour la quasi-totalité des autres organismes. Le terme extrêmophile est le plus souvent employé pour rapporter des microorganismes procaryotes, puisque la majorité appartient au domaine des *Archaea* (Quérellou, 2010).

Le concept d'extrémophilie, à la différence de celui de résistance aux conditions extrêmes, implique que l'ensemble de la machinerie cellulaire soit adapté aux conditions extrêmes et que les cellules fonctionnent de manière optimale dans ces conditions (Quérellou, 2010).

### I.2- Les conditions des environnements extrêmes

Les environnements extrêmes ont un pH inférieur à 5 et supérieur à 9, pression supérieure à 20 MPa, température supérieure à 50 °C ou inférieure à 10 °C et concentration de NaCl supérieure à 3 et 4% jusqu'à saturation 35% (Grégoire *et al.*, 2009).

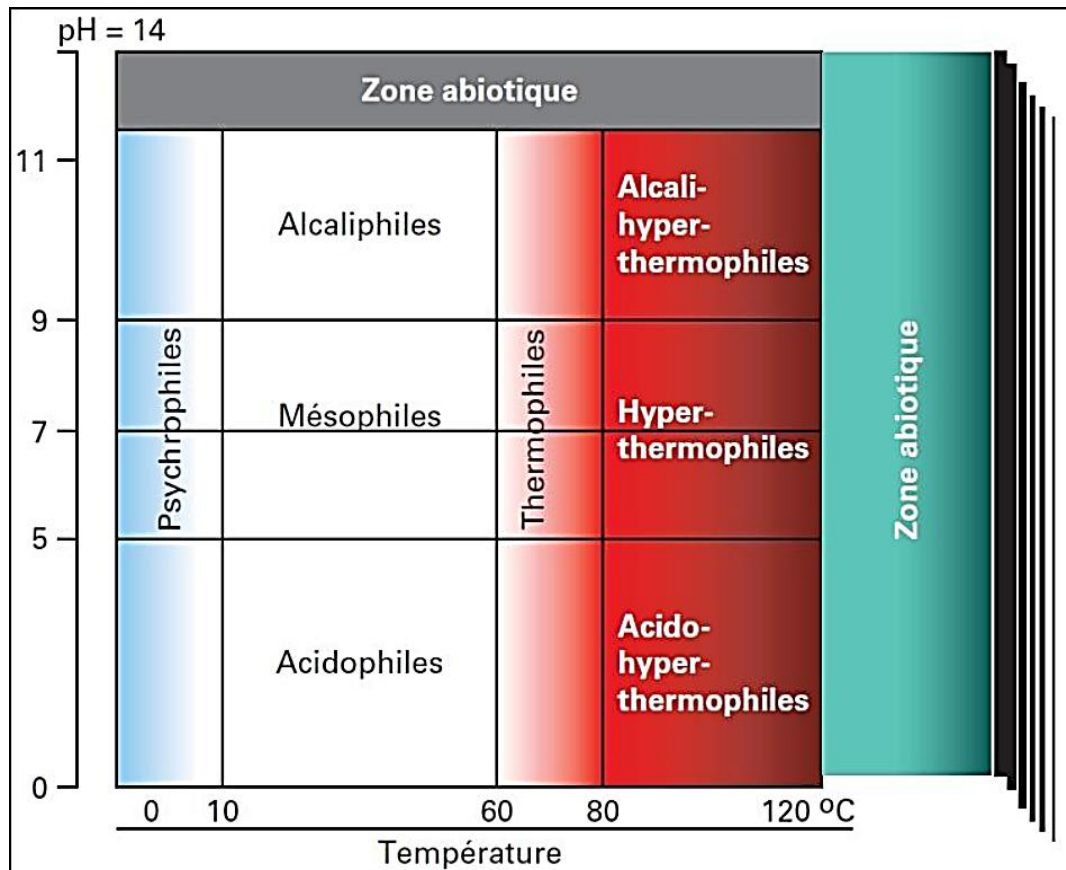
Beaucoup d'organismes peuvent se développer dans ces conditions mais pas nécessairement de façon optimale ; sont les extrêmotrophes (MacElroy, 1974).

En 2003, Wright a proposé le terme « extrêmodure » pour décrire les micro-organismes qui peuvent survivre, mais ne croient pas dans ces environnements.

### I.3-Catégories des extrêmophiles

Parmi les micro-organismes extrêmophiles, on rencontre ceux qui vivent en présence de fortes concentrations en sel « halophiles » ceux qui développent à des températures froides ou chaudes « psychrophiles et thermophiles », et /ou dans des milieux très acides ou basiques « acidophiles et alcaliphiles » ou sous pression élevées piézophiles (figure1).

Beaucoup d'extrêmophiles peuvent être classés sous plusieurs catégories, on parle souvent de polyextrémophilie en sachant qu'un environnement est souvent caractérisé par deux, voire plusieurs paramètres extrêmes (Horikoshi et Bull, 2011).



**Figure 1.** Terminologie des extrêmophiles en fonction de la température (axe des X) et du pH (axe des Y). Le même type de combinaison s'applique en XY pour les facteurs (thermo, acido, alcali) x (piézo, halo, etc.). Les zones abiotiques sont représentées schématiquement (Quérellou, 2010).

#### I.4-Intérêt biotechnologique des extrêmophiles

Au cours de l'évolution, les micro-organismes extrêmophiles développent des stratégies adaptatives très variées, ils présentent un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules permettant le développement de manière optimale (Querellou, 2010).

Les connaissances sur les extrêmophiles sont employées pour développer de nouveaux bioproduits, bioprocédés dans plusieurs domaines, tel que les industries des produits chimiques, pharmaceutiques, de produits de beauté, de textiles, de papier et alimentaire (Antranikian, 2009).

## II-THERMOPHILES

### II-1-Définition

Thermophile du grec thermê; chaleur et philein; aimer, sont des organismes qui ont besoin d'une température élevée pour vivre. Ils ont été découverts à la fin des années 1960 par Thomas Brock dans le parc national de Yellowstone.

### II-2-Classification des thermophiles

La classification des organismes vivants sur la base de leurs températures optimales de croissance est considérée comme un aspect fondamental de la taxonomie microbiologique (Wiegel et Caranella, 2001).

Selon Stetter (1996), les organismes thermophiles sont des êtres vivants qui se développent à des températures supérieures à 45°C. Cette définition est intéressante, car elle définit trois sous catégories au sein des thermophiles :

- Les thermophiles modérés dont la température optimale de croissance se situent entre 55 et 65 °C ;
- Les thermophiles extrêmes se développent à des températures entre 65 et 80°C ;
- Les hyperthermophiles dont la température optimale de croissance est supérieure à 80°C.

### II-3-Intérêt biotechnologiques des thermophiles

Les thermophiles représentent une nouvelle frontière pour la biotechnologie, On peut distinguer deux types d'application différentes, la première repose sur l'utilisation directe des organismes pour les applications liées à la bioremédiation et à la biolixiviation, le second type repose sur l'utilisation des biomolécules, ce sont les enzymes mais aussi les protéines, les lipides et les osmolytes qui sont convoités pour divers procédés se déroulant à haute température et intéressant des domaines aussi variés que la chimie, la pharmacie, l'agro-alimentaire, ou encore la biologie moléculaire (Querellou, 2010).

Ces enzymes ont déjà trouvé ou pourraient trouver des applications dans le blanchissement du papier, la conversion de l'amidon en dérivés sucrés, la dégradation de composés protéiques résistants, l'industrie textile ou le travail de laboratoire sur l'ADN (Querellou, 2010).



Plusieurs enzymes provenant de thermophiles des sources hydrothermales sont commercialisées : nombreuses polymérase, ligases, diverses protéases, phosphatases alcalines, etc.

### **II.4-Niches écologiques des thermopiles**

#### **II.4.1-Biotopes naturels**

Les micro-organismes thermophiles sont retrouvés dans des habitats géothermiques naturels largement répandus sur notre planète et souvent associés à des zones tectoniques actives. Ces écosystèmes peuvent avoir une origine :

- Géothermie terrestre : la nature de l'eau va dépendre des roches traversées et elle est généralement associée à une activité volcanique, la température de l'eau in situ sera en fonction de la profondeur d'origine pour atteindre des températures inférieures à 100°C et des pH acides ou basiques à la surface de la terre. C'est le cas des sources chaudes localisées en Islande, aux Açores ou encore dans le Parc national de Yellowstone (figure 2) (Gregoire, 2009).

- Hydrothermale océanique profonde : le fluide hydrothermal jaillit au niveau du plancher océanique à travers de fumeurs noirs où le liquide sort à des températures variant de 20 à 400°C selon la localisation (Gregoire, 2009).

- Pétrolière : certains de ces gisements pétroliers sous-marins et continentaux sont situés entre 1,5 et 4 km de profondeur et présentent des températures allant de 60 à 130°C et des pH généralement neutres (Gregoire, 2009).

#### **II.4.2-Biotopes artificiels**

Les thermophiles habitent également dans les systèmes thermiques artificiels tels que les circuits d'alimentation et les réservoirs d'eau chaude, les centrales nucléaires, les usines géothermiques, les puits et forages de pétrole, le compost et les bioréacteurs (Gomri, 2012).



**Figure 2.** Photographie de différents environnements extrêmes. (Gregoire, 2009)

a : Sources chaudes dans le Parc national de Yellowstone–USA, b : Cheminée hydrothermale d’anhydrite sur Rainbow, dorsale Médio-Atlantique, c : Site thermal de Dallol, Éthiopie, d : Source hydrothermale volcanique des Açores.

*Partie*  
*Expérimentale*

*Chapitre I*  
*Matériels et Méthodes*

I- MATERIELS ET METHODS

I.1- Objectifs du travail

Notre propos est d'essayer de faire un screening des souches thermophiles à partir de trois niches écologiques situant dans la zone thermale de Hammam Bouhanifia et déterminer le pouvoir hydrolytique et antimicrobien des souches isolées.

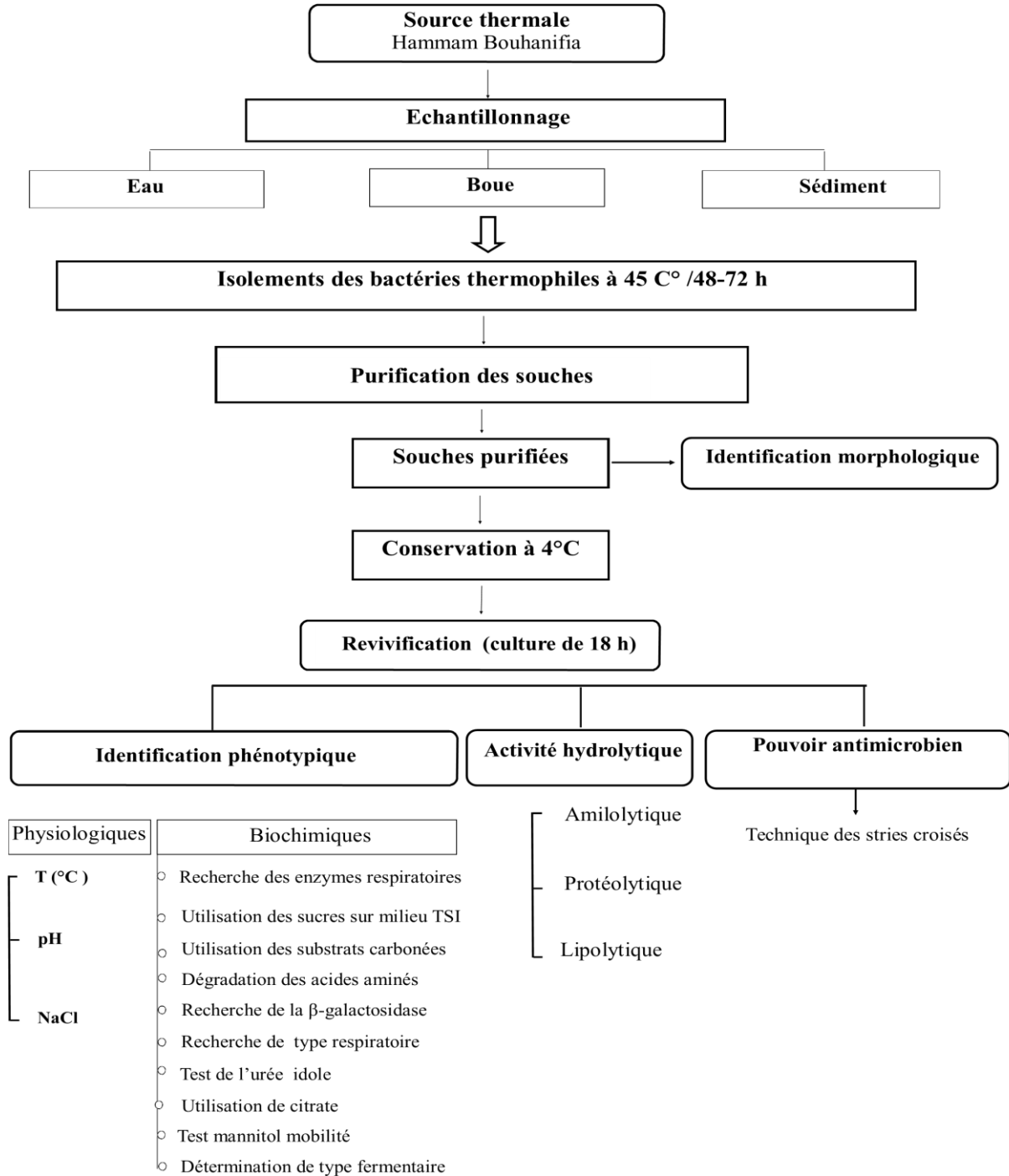


Figure 3. Diagramme de protocole expérimental.

## I.2- Lieu de travail

Ce travail a été réalisé au Laboratoire pédagogique de microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université IBN KHALDOUN et Laboratoire de reproduction des animaux de la ferme, pour une durée de 4 mois allant de Mars à Juin 2019.

## I.3-Présentation du site de prélèvement

Le prélèvement des échantillons (eau, boue et sédiment) a été réalisé à partir de la source thermale de Hammam Bouhanifia, Mascara, Algérie ; cette source est située à 100km au sud d'Oran (capital du ouest algérienne) et 25km de la ville de Mascara, à 230 m d'altitude, source très appréciées et très fréquentées (figure 4)

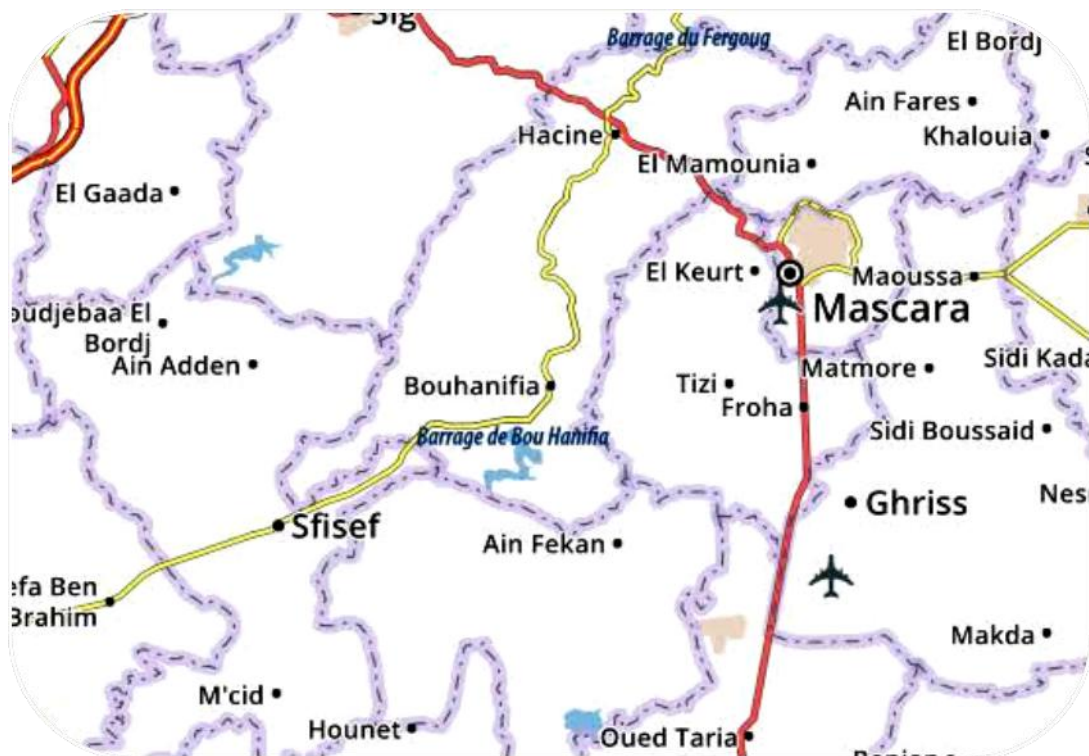


Figure 4. Localisation de la zone d'étude (Boughalali, 2003)

### I.4- Echantillonnage

Les échantillons (eau, boue et sédiment) ont été prélevés entre le mois de Février et Avril 2019, Le choix des échantillons à traiter est réalisé de façon à varier la nature et le lieu de prélèvement de ces derniers pour qu'ils soient représentatifs.

- Les échantillons d'eau sont collectés à partir des bords de 5 points différents à une profondeur de 10 à 15 cm dans des flacons stériles de 250ml.
- Les prélèvements de la boue et du sédiment s'effectuent à l'aide d'une spatule stérile et sont récupérés dans des sacs stériles :
  - Les échantillons de boues sont prélevés, en éliminant la partie superficielle et récupérés ces derniers à une profondeur de 15 à 30 cm.
  - Les échantillons de sédiments sont recueillis à partir de la partie superficielle des caillots qui entoure la source thermale.
- Les prélèvements sont ensuite transportés au laboratoire dans une glacière et conservé à 4°C.



**Figure 5.** Sites des prélèvements des échantillons d'eau, boue et de sédiment.

### I.5- Isolement et purification des isolats

L'isolement des souches a été effectué dans un délai qui ne dépasse pas les 24h après les prélèvements, les échantillons sont ensemencés sur six milieux de culture différents (annexe2). Ces derniers sont conçus pour cultiver le plus grand nombre des bactéries thermophiles.

### **Mode opératoire**

#### **Dilution décimale**

- Pour chaque type d'échantillon (eau, boue et sédiment), une série de dilutions décimales ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  et jusqu'aux  $10^{-4}$  pour l'eau) a été réalisée à partir de la solution mère dans l'eau physiologiques et l'eau de la source thermale stérile.
- Pour préparer la suspension mère de boue et de sédiment, 1g de chaque échantillon est dissous dans 9 ml d'eau physiologique stérile. Une homogénéisation de la suspension est effectuée à l'aide d'un agitateur vortex.

#### **Ensemencement**

- Prélever aseptiquement 1 ml de chaque suspension et le déposer dans des boîtes de Pétri.
- Faire fondre les six milieux d'isolement. Lorsqu'ils sont refroidis à 45°C, les couler aseptiquement dans les boîtes de Pétri contenant les inocula dilués qui ne doit être pas excéder 15 minutes.
- Agiter doucement les boîtes ensemencées par des mouvements circulaires et en forme de huit afin d'assurer un mélange homogène sans faire les bulles.
- Laisser les boîtes solidifier.
- Incuber à 45 °C jusqu'à l'apparition des colonies (24 à 72heures).
- De chaque milieu, environ une dizaine des colonies à différents aspects macroscopiques sont sélectionnées et purifiées par repiquages successifs sur les mêmes milieux d'isolements.

#### **Conservation**

Les souches pures sont conservées à 4 °C dans les mêmes milieu d'isolement additionnés de 3% de glycérol.

### **I.6- Identification des souches purifiées**

L'identification des isolats est basée sur leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques.



## **I.6.1-Caractérisation culturelle et morphologique des souches**

### **I.6.1.1- Aspect macroscopique**

Une fois les souches purifiées, l'observation de l'aspect macroscopique des colonies (forme, taille, pigmentation, opacité, etc.), permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

### **I.6.1.2- Aspect microscopique**

La morphologie, l'arrangement cellulaire et le Gram de l'isolat sont déterminés sur des cultures jeunes par la technique de coloration différentielle décrite par Gram (1884) à l'aide d'un microscope optique (ZEISS - Weast Germany)

## **I.6.2- Caractérisation physiologique**

L'influence de la concentration en NaCl, de la température et du pH sur la croissance est déterminée sur milieu solide en variant un des paramètres alors que les deux autres sont maintenus constants. La croissance est contrôlée périodiquement entre 24 et 72 heures d'incubation.

### **I.6.2.1- Influence de la Température**

L'évaluation de l'effet de la température sur la croissance des souches a été effectuée par incubation à différentes température (37, 45,55 et 65°C) des souchesensemencées sur gélose pendant 48 heures.

### **I.6.2.2- Influence de la concentration en NaCl**

L'évaluation de la croissance des souches en fonction de la salinité a été déterminée par la culture des souches sur le milieu M1 (annexe 2) à un pH 7, contenant des concentrations en NaCl de 0 ; 0,5 ; 5 ; 9 et 12% (p/v) après incubation à 45 °C pendant 48 heures.

### **I.6.2.3 -Effet du pH**

L'influence du pH sur la croissance a été déterminée par la culture des souches sur milieu solide ajusté à des pH allant de 3 à 10. L'incubation a été faite à 45°C pendant 48 heures.

### **I.6.3- Caractérisation biochimique**

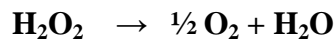
La composition chimique des milieux de culture pour l'analyse biochimique est rapportée dans le tableau (Annexe 2).

#### **I.6.3.1-Recherche de la catalase**

##### **Principe**

La catalase est un enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) avec le dégagement d'oxygène selon la réaction suivante (Marchal et Bourdon, 1982)

##### **Catalase**



##### **Mode opératoire**

Sur une lame de verre propre, contenant une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes, déposer à l'aide d'une anse stérile une quantité suffisante de la culture.

##### **Lecture**

La présence d'une catalase se traduit par une effervescence.

#### **I.6.3.2- Type respiratoire (VF)**

##### **Principe**

La mise en évidence du type respiratoire des souches est réalisée selon le protocole de **Guiraud (1988)**, sur une gélose profonde viande foie (VF) coulés dans des tubes.

##### **Mode opératoire**

- Répartir la gélose VF en tube et régénérée par un chauffage durant 30 min au bain-marie.
- Ensemencer la souche à identifier à l'aide d'une pipette pasteur prolongée au fond du tube.
- Remonter en décrivant une spire de façon à ensemencer uniformément le milieu.
- Laisser le milieu solidifier et incuber à 45°C pendant 24-72 heures.

### **Lecture**

- Les bactéries aérobies strictes se développent uniquement dans la zone superficielle.
- Les aéro-anaérobies facultatives se développent sur la totalité du tube
- Les anaérobies stricts se développent au fond du tube.

### **I.6.3.3- Mannitol mobilité**

#### **Principe**

C'est une gélose molle conditionnée en tubes qui permet d'étudier simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries (Gerhardt et *al.*, 1994)

#### **Mode opératoire**

L'ensemencement du milieu s'effectue par une piqûre centrale jusqu'au fond du tube avec la souche à tester à l'aide d'une pipette pasteur stérile, puis incubé à 45°C durant 24 heures.

#### **Lecture**

##### ➤ *Fermentation du mannitol*

- La lecture de l'utilisation du mannitol est possible grâce à la présence d'un indicateur de pH, le rouge de phénol. L'utilisation du mannitol acidifie le milieu qui peut ainsi être révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune); la bactérie est dite mannitol positif (+).
- Si la couleur reste rouge la bactérie ne fermente pas le mannitol; elle est dite mannitol négatif(-).

##### ➤ *La mobilité*

Si la bactérie est immobile, on observe la culture uniquement au niveau de la piqûre centrale par contre si la bactérie est mobile on observe une répartition des colonies dans le milieu.

### **I.6.3.4- Utilisation des sucres TSI**

#### **Principe**

La fermentation du glucose avec production d'acide, l'oxydation du saccharose et/ou du lactose, la libération d'H<sub>2</sub>S et de CO<sub>2</sub> sont appréciées sur le milieu Triple Sugar Iron (TSI) (Harley et Prescott, 2002).

### **Mode opératoire**

- A partir d'une suspension bactérienne de 18 heures, ensemercer à l'aide d'une pipette Pasteur le culot par piqûre centrale puis la pente par des stries serrées.
- Incuber les tubesensemencés et le témoin à 37°C pendant 24 heures.

### **Lecture**

La fermentation du lactose / saccharose sur la pente qui se traduit par virage au jaune.

La présence de gaz qui se matérialise par le décollement du culot et/ou la présence de bulle d'air.

La production de H<sub>2</sub>S qui se traduit par une coloration noire

### **I.6.3.5-Utilisation de citrate**

#### **Principe**

Le milieu utilisé est le Citrate de Simmons, qui ne contient que le citrate comme seule source de carbone. Seules les bactéries possédant une enzyme citrate perméase seront donc capables de se développer sur ce milieu, l'utilisation de citrate provoque l'alcalinisation du milieu (Marchal et Bourdon, 1982).

#### **Mode opératoire**

- La pente du milieu estensemencée avec la suspension de la bactérie à tester par des stries sur toute la surface.
- Incuber à 45°C, pendant 24 heures.

#### **Lecture**

Si la bactérie utilise le citrate comme seule source de carbone, elle entraîne une alcalinisation du milieu, d'où le virage du vert au bleu.

Pour la bactérie citrate négative, le milieu garde sa couleur d'origine (verte).

### **I.6.3.6- Utilisation des substrats carbonés**

#### **Principe**

Les bactéries peuvent être utilisées les glucides par deux voies métaboliques différentes :

- Une voie fermentative, dans laquelle toutes les réactions peuvent avoir lieu en l'absence de l'oxygène de l'air ; il se forme des catabolites de dégradation en particulier acides qui s'accumulent dans le milieu dont le pH baisse sensiblement
- Une voie oxydative dans laquelle l'oxygène de l'air est obligatoirement utilisé, et peu de catabolites acides sont formés.
- La recherche d'une acidité apparue par oxydation d'un glucide doit donc faire dans un milieu peu tamponné, tel que le milieu MEVAG.

### **Mode opératoire**

- Régénérer le milieu au bain- marie.
- Ajouter aseptiquement le glucide étudié (xylose, maltose et galactose) de façon à obtenir une concentration finale de 1%, et l'agiter doucement.
- Laisser le milieu solidifier.
- Ensemencer par piqure centrale.
- Incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures.

On a testé seulement la dégradation des sucres par voie oxydative.

### **Lecture**

L'apparition de couleur jaune indique la dégradation de sucre.

### **I.6.3.7-Recherche de $\beta$ - galactosidase**

#### **Principe**

Le test ONPG ou test de l'ONPG-Hydrolase est un test complémentaire celui-ci permet, lorsque la bactérie est Lactose (-) de trouver s'il y a présence d'une B-galactosidase que l'on reconnaît grâce à la coloration en jaune du milieu (Joffin et Leyral, 2006).

#### **Mode opératoire**

- Préparer une suspension dense de bactérie testée en eau distillée stérile.
- Avec une pince flambée et refroidie /stérile déposer un ½ disque d'ONPG
- Placer au bain-marie à 37°C
- Lire après 30 minutes

### **Lecture**

- L'apparition d'une coloration jaune indique que la bactérie possède la  $\beta$ -galactosidase, elle est dite ONPG positive (+)
- Si le milieu reste incolore la bactérie ne possède pas la  $\beta$ -galactosidase, elle est dite ONPG négative (-).

### **I.6.3.8-Production de l'uréase**

#### **Principe**

L'enzyme hydrolysant l'urée est recherché sur une gélose à l'urée de Christensen ou sur le milieu Urée indole. La production de l'uréase libère le carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu d'où virage de l'indicateur coloré de l'orange en rose ou en rouge-violacé (Harley et Prescott, 2002).

#### **Mode opératoire**

- Ensemencer le milieu de l'urée de Christensen par quelques gouttes de la suspension de bactérie à tester.
- Incuber à 37°C pendant 24 heures.

### **Lecture**

La production l'uréase se manifeste par un changement de la coloration au rouge ou rose, du fait d'alcalinisation du milieu.

### **I.6.3.9- Tests ODC, LDC, ADH**

#### **Principe**

Les activités enzymatiques de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH) sont examinées en anaérobiose, sur les bouillons de Moëller qui permettent de montrer la présence des décarboxylases et dihydrolase bactériennes par la mise en évidence de l'acidification du milieu et sa ré-alcalinisation (Joffin et Leyral, 2006).

### **Mode opératoire**

- Remplir les milieux Moëller (LDC ODC et LDH) dans des éppindorffs stériles.
- Ensemencer ces milieux par la suspension bactérienne à l'aide d'une anse stérile.
- Si le milieu n'est pas plein il faut le recouvrir par l'huile de paraffine pour assurer l'anaérobiose (car il s'agit des enzymes anaérobies cytoplamiques).
- Incuber à 37°C pendant 24 heures.

### **Lecture**

Un résultat positif se traduit l'apparition d'une couleur violette (ré-alcalinisation de milieu).  
Si le résultat est négatif le milieu deviendra jaune.

### **I.6.3.10-Test urée-indole**

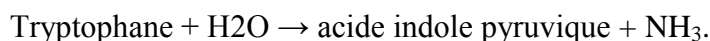
Le milieu urée-indole permet en 24 heures de réaliser trois tests biochimiques qui permettent l'identification de germes, Ces trois tests sont : Le test uréase, le test TDA, et le test indole.

#### **A. Production d'indole**

Ce test sert à déterminer si la bactérie produit de l'indole à partir de tryptophane (acide aminé).

#### **B. Recherche de tryptophane désaminase (TDA)**

Le tryptophane désaminase (TDA) dégrade le tryptophane selon la réaction suivante :



### **Mode opératoire**

- A l'aide d'une anse stérile, ensemencer le milieu urée indole avec la suspension bactérienne à identifier (culture de 18 heures).
- Incuber à 45°C pendant 24heures.

### **Lecture**

La présence d'indole se manifeste par un anneau rouge, après addition du réactif de Kovacs.

L'acide indole pyruvique forme un précipité marron foncé en présence d'un réactif (chlorure de fer en solution acide).

### **I.6.3.11-Caractérisation de type fermentaire (Clarck et lubs):**

#### **A. Réaction au rouge de méthyle (RM)**

La production d'acides mixtes par les souches est mise en évidence par ensemencement du bouillon glucosé de Clark et Lubs. La lecture se fait par addition de quelques gouttes de réactif au rouge de méthyle et le virage de la couleur du bouillon au rouge indique la production des acides mixtes (Harley et Prescott, 2002).

#### **B. Réaction de Vogues Proskauer (VP)**

Le test VP (Vogues-Proskauer) s'est fait sur le milieu Clark et Lubs et met en évidence la production d'acétoïne. La production d'acétylméthylcarbinol (réaction de Voges-Proskauer) par les isolats est révélée par l'apparition d'une coloration rose du bouillon de Clark et Lubs après addition de 0,5 ml d' $\alpha$ -naphtol et le même volume de soude à 40% (p/v) (réaction de Barrit) (Harley et Prescott, 2002).

#### **Mode opératoire**

Ensemencer le milieu Clark et Lubs avec la souche bactérienne à analyser. Après avoir incubé à 37C° pendant 24 heures nous avons partagé le milieu en deux tubes pour réaliser les deux tests ;

- Réaction de Voges-Proskauer : en ajoutant quelques gouttes du réactif VP1 et le même volume du réactif VP2. La lecture s'effectue après quelques minutes.
- Test du rouge de méthyle : 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle sont additionnées dans les tubes. La lecture se fait immédiatement.

#### **Lecture**

Pour la réaction de VP ; le virage de la couleur de milieu du rose au rouge après ajouts des réactifs VP1 et VP2 signifie un résultat positif, par contre le milieu reste rose pour le résultat négatif.

Concernant le test RM, la souche est RM positif si le milieu est devenu rouge après l'addition du réactif de rouge de méthyle et dans le cas contraire (RM négatif), il vire au jaune.



## **I.7- Recherche de l'activité hydrolytique**

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

Les souches bactériennes sont cultivées sur un milieu de base contenant 1% d'amidon soluble (annexe 2). Les boîtes sont incubées à 45 °C pendant 48h. Après incubation, le milieu gélosé est recouvert d'une solution de Lugol. La présence d'une activité amylolytique se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des colonies. Par contre, un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture (De Vos *et al.*, 2009).

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

#### **I.7.2.1-Hydrolyse de la caséine**

La dégradation de caséine est déterminée par l'ensemencement des souches sur gélose au lait (annexe2). La présence de cette activité est détectée par la formation d'un halo clair autour des colonies (Roxana *et al.*, 2009).

#### **I.7.2.2-Hydrolyse de la gélatine**

Les bactéries qui ont une activité protéolytiques forte, produisent en général une gélatinase. La gélatinase ou collagénase est une protéase qui hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides.

#### **Mode opératoire**

- Verser 9 ml d'eau peptonée stérile dans des tubes à essais stériles.
- Ajouter les morceaux de gélatine préparés (annexes 2) dans chaque tube, puis ensemenecer avec quelques gouttes de la suspension bactérienne à tester.
- Incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures.

#### **Lecture**

Après incubation, les tubesensemencés ont été placés dans le réfrigérateur à 4°C pendant 30 minute si la gélatine est hydrolysée, indique que la souche possède la gélatinase.

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

L'estérase est recherchée par le test d'hydrolyse des Tween 20 et 80.

### ▪ Hydrolyse des Tween 20 et 80

Cette activité est recherchée par l'ensemencement des souches sur milieu à base de tween 20 ou 80 (annexe2). Après incubation, le développement d'un précipité (zone opaque) autour des colonies témoigne la présence d'une lipase (Gonzalez *et al.*, 1978).

### Mode opératoire

- A partir d'une culture bactérienne de 18 heures, ensemercer le milieu solide à base de tween 20 /tween 80 par spots ou par stries.
- Incuber 24 à 48 heures à 45°C.

### Lecture

Après l'incubation, les colonies des souches possédant les lipases sont entourées d'un halo opaque.

### I.8- Screening primaire de l'activité antimicrobienne

Le screening primaire permet de détecter *in vitro* et sur milieu gélosé l'effet inhibiteur des microorganismes sélectionnés vis-à-vis des germes cibles, il est rapide, sensible, et raisonnable. Il peut être réalisé par plusieurs techniques.

#### I.8.1-Technique des stries croisées (Cross streak)

Cette technique présente l'avantage de pouvoir utiliser plusieurs micro-organismes tests pour la même souche étudiée et sur la même boîte.

Elle consiste à ensemercer le germe sélectionné en strie au centre d'un milieu de culture gélosé, et après incubation (3 à 7 jours) à une température appropriée, le milieu est ensemené par les germes tests en stries de manière à former un angle de 90° avec le germe d'intérêt. Après ré-incubation, l'interaction microbienne est analysée par la mesure de la zone d'inhibition (Lertcanawanichakul et Sawangnop, 2008)

Cette technique présente l'avantage de pouvoir utiliser plusieurs micro-organismes testés pour la même souche étudiée et sur la même boîte.

### ▪ Mode opératoire

Parmi les 85 souches bactériennes isolées, on a sélectionné 10 souches selon leurs caractéristiques distinctives (morphologiques et physiologiques).

L'activité antimicrobienne des isolats sélectionnés est évaluée sur le milieu Muller-Hinton par la technique de stries croisées contre trois germes : une bactérie à Gram positif, une bactérie à Gram négatif et une levure.

Les souches sélectionnées sont subies à un stress en cultivant dans un milieu défavorable (milieu M1 additionné de NaCl à 12% incubé à 37°C pendant 48 à 72 heures).

Après incubation, une colonie de chaque souche bactérienne a été prélevée par une pipette Pasteur et a été introduite dans un tube contenant 10 ml d'eau physiologique stérile en formant une suspension ensuite l'inoculum est ajusté à l'étalon 0,5 Mac Farland.

### Les bactéries-tests

Les souches microbiennes tests utilisées dans l'activité antimicrobienne sont :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Candida albicans* issus de banque de gène de Laboratoire de recherche de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire (LBGMSS) de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université De Mascara

### Préparation et ajustement de l'inoculum

- Les bactéries tests ont subi une revivification dans un bouillon d'enrichissement, après 18 heures d'incubation ; 0.1ml de chaque suspension bactérienne estensemencé en surface dans des boîtes de Pétri contenant le milieu spécifique de chaque germe. L'incubation s'est faite à 37°C pendant 18 à 24 heures.

- Chaque microorganisme test est standardisé de la même façon que celui de souches isolées, sauf que l'absorbance de l'inoculum de la levure était comprise entre 0.12-0.15 à une longueur d'onde de 623 nm (Bastide *et al.*, 1986)

**Réalisation de la technique des stries croisées**

- Ensemencer la souche sélectionnée par un seul trait centrale dans une boîte de Pétri contenant le milieu Muller-Hinton ;
- Incuber à 37°C pendant 48 à 72 heures ;
- Ensuite les souches tests seront ensemencées par une strie croisée, incubées à 37°C pendant 48 heures ;
- La présence d'une activité antimicrobienne se traduit par l'inhibition totale ou partielle de croissance des souches tests.

*Chapitre II*

*Résultats et discussion*

### **II.1-Isolement et purification des isolats**

Les six milieux de cultures utilisés ont permis l'isolement d'une centaine de souches à partir de trois niches écologiques (eau, boue et sédiment) de hammam Bouhanifia.

Après purification Quatre-vingt-cinq (85) isolats ont été retenus et désignés selon un code composé de deux lettres (BE, BS et Bb) et de numéros. Sur ce total, 32 isolats sont issus de l'eau, 30 isolées à partir de sédiment et 23 isolats sont obtenues à partir de boue.

Les observations des premiers isolements ont montré une croissance importante et rapide sur les milieux de culture M1, M2 et GN par rapport aux autres milieux (colombia, triptica-soja et milieu M4). Concernant les échantillons ensemencés en milieux préparés à base d'eau de source stérile, un grand nombre des colonies sont apparues après 24 heures d'incubation alors que la croissance est un peu lente sur les milieux préparés à base d'eau distillée cela peut être justifié par l'adaptabilité de milieu de culture (garde la même composition minérale).

Différents aspects macroscopiques des colonies sont observés. Par la suite, les souches purifiées sont repiquées et conservées à 4°C sur les milieux M1 et M2, ce choix peut être justifié par le fait que la croissance de tous les isolats, était meilleure et plus rapide sur ces milieux (les colonies apparaissaient après 24 heures d'incubation à 45°C).

### **II.2-Identification des souches purifiées**

#### **II.2.1- Caractérisation culturelle et cellulaire des isolats**

##### **II.2.1.1- Aspect macroscopique**

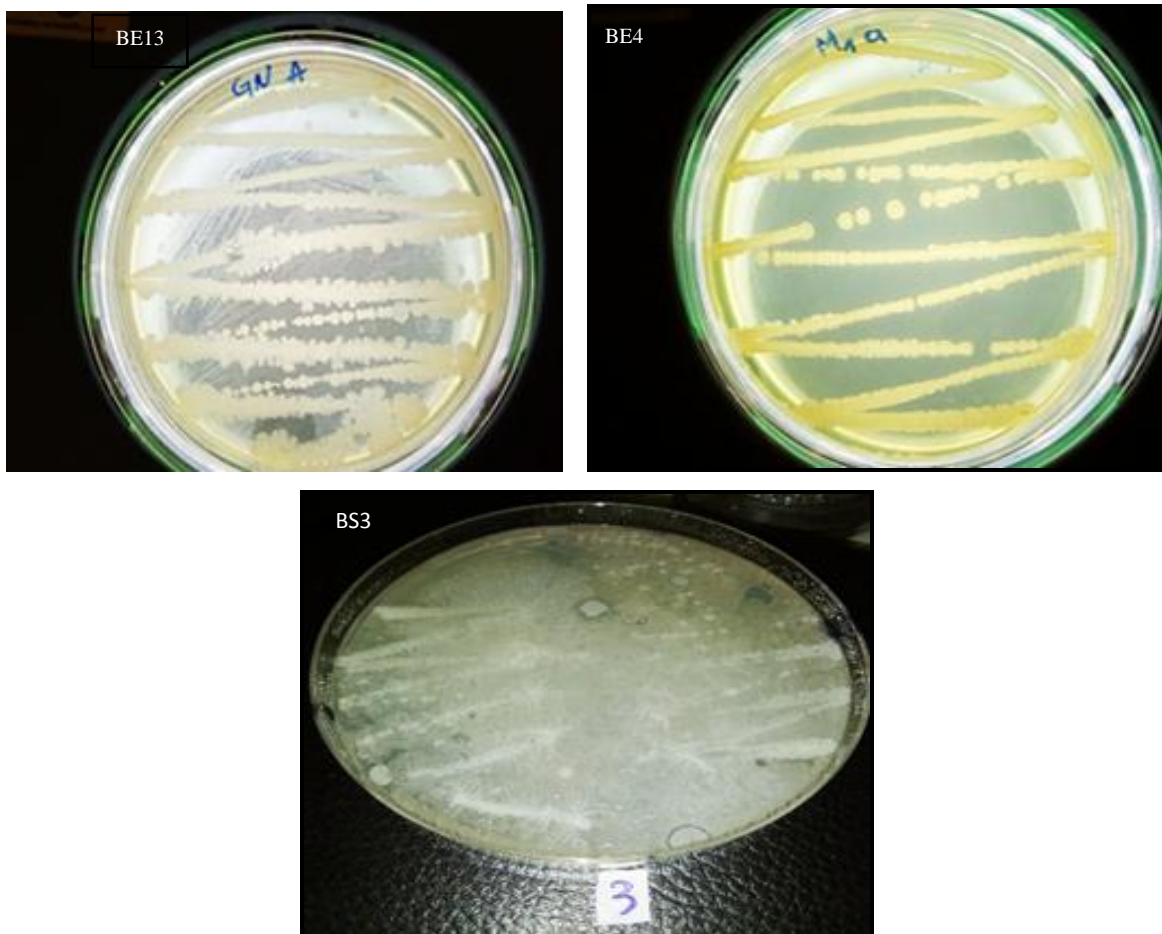
L'observation macroscopique des souches, a permis de dégager trois aspects différents de colonies :

Colonies de type lisse (L) : Ce type cultural est le plus rencontré, caractérisé par des colonies de différentes formes ondulé, lobé et filamenteuse, de consistance crémeuse, translucide à opaque à la lumière, transparente dans certains cas ; leur surface est lisse.

Colonies de type rugueux (R) : Les colonies ont une surface rugueuse, de différents formes ; arborisant, ondulée, à bords dentelés ou filamenteuses, la plus part translucide à la lumière.

Colonies de type muqueux (M) : Colonies muqueuses et bombées, translucides, filamenteuses pour la plus parts.

L'observation de différent aspect macroscopique est représentée dans la figure 6.



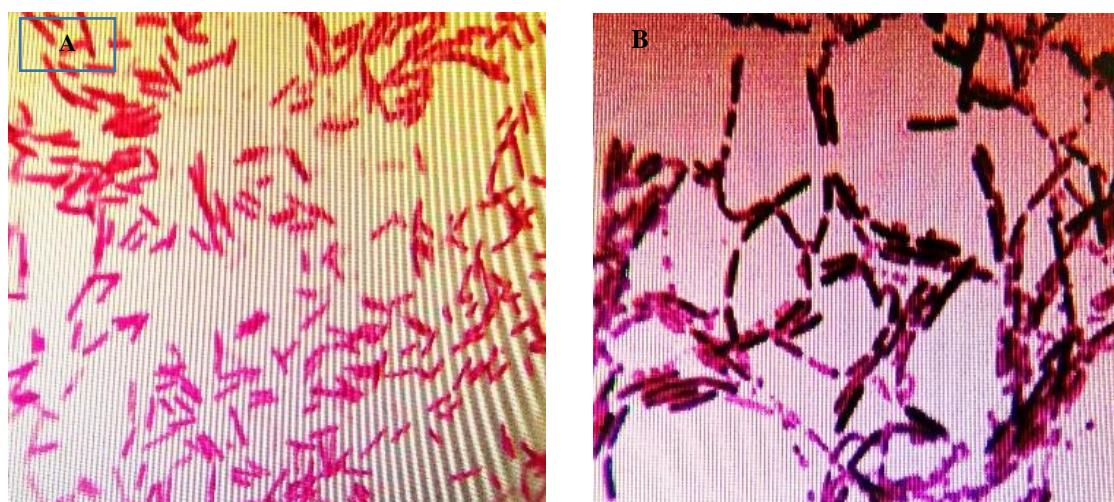
**Figure 6.** Aspects macroscopique des souches Isolées type l : souche BE4 ; type r : BE13 ; type m : BS3.(Photo Originale)

### II.2.1.2 Aspect microscopique

La coloration de Gram, a révélé que 76 souches sont à Gram positif et les restes sont à Gram négatif. Les formes cellulaires observées en microscopie photonique sont les suivantes: Des bacilles parfois enflés à l'extrémité isolés ou arrangées en longues chaînes ou en chaînettes. Ainsi différents types phénotypiques ont été retrouvés aussi bien dans les échantillons de la source d'eau thermale que dans la boue et sédiment. Ceci qui nous laisse supposer que la température n'est pas l'unique facteur qui joue sur la diversité des organismes présents dans ce type d'environnement. D'autres facteurs comme la composition minérale et organique, la localisation géographique des sites géothermaux peuvent également entrer en jeu.

## RESULTATS ET DISCUSSION

La figure 7 représente les résultats de la coloration de Gram pour nos isolats.



**Figure 7 :** Observation au microscope photonique à l'immersion (X100).  
**A :** Souche à Gram négatif BS14 ; **B :** Souche à Gram positif BE7. (Photo Originale)

**Tableau1 :** Caractérisation morphologiques des isolats

Souche	Gram	Forme des cellules	Forme des colonies	Aspect	Couleur	Opacité
BE1	+	Bacille	IR	S	Beige	Tc*
BE2	+	Bacille	IR	S	Beige	Tc*
BE3	+	Bacille	Arb/Fil	S	Crème	Tc
BE4	+	Bacille	Arb	L	Beige	Tc
BE5	+	Bacille	IR	L	Jaune	Tp
BE6	+	Nd	Lobée	R	Beige	Tc
BE7	+	Bacille	IR	R	Crème	Op
BE8	+	Bacille	Arb	L	Beige	Tc
BE9	+	Bacille	Lobée	R	Beige	Op
BE10	+	Bacille	Lobée	L	Beige	Tc
BE11	+	Bacille	Fil	R	Beige	Tc*
BE12	+	Bacille	Circulaire	R	Beige	Tc
BE13	+	Bacille	Den	S	Blanchâtre	OP
BE14	+	Bacille	Lobée	C	Beige	Tc*
BE15	+	Bacille	Fil	S	Blanchâtre	Op
BE16	+	Bacille	Fil	S	Blanchâtre	Op
BE17	+	Bacille	Lobée	C	Beige	Tc*
BE18	+	Nd	Fil	S	Blanchâtre	Op
BE19	+	Bacille	Lobée	C	Beige	Tc*
BE20	+	Bacille	Fil	S	Blanchâtre	Op
BE21	+	Bacille	Ond	M	Beige	Op
BE22	+	Bacille	Arb	S	Beige	Op
BE23	+	Bacille	Arb	R	Crème	Tc
BE24	+	Bacille	Lobée	L	Beige	Op
BE25	+	Bacille	IR	R	Crème	Op
BE26	+	Bacille	Lobée	L	Beige	Op
BE27	+	Bacille	Lobée	M	Blanchâtre	Tp
BE28	+	Bacille	Lobée	C	Crème	Op
BE29	-	Bacille	Lobée	C	Crème	Tc
BE30	+	Bacille	Lobée	L	Blanchâtre	Tc
BE31	+	Bacille	Arb	M	Blanchâtre	Tc
BE32	+	Bacille	Fil	M	Crème	Tc*



## RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 1 (suit) :** Caractérisation morphologiques des isolats

Souche	Gram	Forme des cellules	Forme des colonies	Aspect	Couleur	Opacité
BS1	+	Bacille	Fil	R	Crème	Tc
BS2	+	Bacille	Fil	R	Crème	Tc
BS3	+	Bacille	Fil	M	Blanchâtre	Tc
BS4	+	Bacille	End	L	Beige	Op
BS5	+	Bacille	Lobé	L	Blanchâtre	Op
BS6	+	Bacille	Rhz	R	Beige	Tp
BS7	+	Bacille	Fil	S	Beige	Tc**
BS8	+	Bacille	Fil	L	Crème	Tc*
BS9	+	Bacille	End	R	Blanchâtre	Tc
BS10	+	Bacille	IR	R	Blanchâtre	Op*
BS11	+	Bacille	IR	R	Blanchâtre	Op*
BS12	+	Bacille	End	L	Beige	Tp
BS13	+	Bacille	End	C	Crème	Op
BS14	+	Bacille	End	S	Beige	Tc
BS15	+	Bacille	Den	R	Beige	Op
BS16	+	Bacille	Den/Fil	L	Beige	Tc
BS17	+	Bacille	IR	M	Blanchâtre	Tc*
BS18	+	Bacille	Fil	S	Beige	Op
BS19	+	Bacille	Fil/Bou	R	Blanchâtre	Op
BS20	+	Bacille	End	L	Beige	Op
BS21	+	Bacille	Fil	R	Crème	Tc
BS22	+	Bacille	End	L	Crème	Tc*
BS23	+	Bacille	End	C	Crème	Op
BS24	-	Bacille	End	M	Crème	Tc
BS25	+	Bacille	Cou/Fil	S	Blanchâtre	Op
BS26	-	Bacille	Lobé	C	Beige	Op
BS27	+	Bacille	Lobé	L	Beige	Tc
BS28	+	Bacille	Bou	R	Blanchâtre	Op
BS29	+	Bacille	Bou	R	Blanchâtre	Op
BS30	+	Bacille	Bou	R	Blanchâtre	Op

**Tableau 1 (suit) : Caractérisation morphologiques des isolats**

Souche	Gram	Forme des cellules	Aspect	Couleur	Opacité
Bb1	-	Bacille	S	Crème	Tc
Bb2	-	Bacille	L	Crème	TC
Bb3	-	Bacille	L	Crème	TC
Bb4	+	Bacille	S	Crème	TC
Bb5	+	Bacille	S	Crème	TC
Bb6	-	Bacille	S	Crème	TC
Bb7	+	Bacille	L	Crème	TC
Bb8	+	Bacille	S	Crème	TC
Bb9	+	Bacille	L	Crème	TC
Bb10	-	Bacille	L	Crème	TC
Bb11	-	Bacille	L	Crème	TC
Bb12	+	Bacille	S	Blanchâtre	TC
Bb13	+	Bacille	S	Crème	TC
Bb14	-	Bacille	L	Crème	TC
Bb15	+	Bacille	S	Blanchâtre	TC
Bb16	+	Bacille	L	Crème	TC
Bb17	+	Bacille	M	Crème	TC
Bb18	+	Bacille	M	Crème	TC
Bb19	+	Bacille	M	Crème	TC
Bb20	+	Bacille	L	Crème	TC
Bb21	+	Bacille	S	Blanchâtre	TC
Bb22	+	Bacille	M	Crème	TC
Bb23	+	Bacille	L	Crème	TC

**BE** : Souche isolée à partir de l'eau de Hammam Bouhanifia.

**BS** : Souche isolée à partir de la boue de Hammam Bouhanifia.

**Bb** : Souche isolée à partir de la boue de Hammam Bouhanifia.

**G** : Gram.

**Forme des cln** : Forme des colonies ; **Fil**: Filamenteux, **Ond**: Ondulée, **Rhz**: Rhizoïde, **Den**: Dentelée, **Bou**: Bouclée, **IR**: Irrégulière, **Cou**: Cotonnée, **Arb**: Arborisant., **Cir** : Circulaire.

**Aspect des colonies** ; **R**: type rugueux, **L**: type lisse, **M**: type muqueux, **S**:type sèche, **C**: Crémeuse.

**Opacité** : **Tp** : Transparent, **Op** : Opaque, **Tc**: Translucide, **Op\***: le centre opaque, **Tc\***: Translucide à opaque. **Tc\*\***: Translucide à transparent.

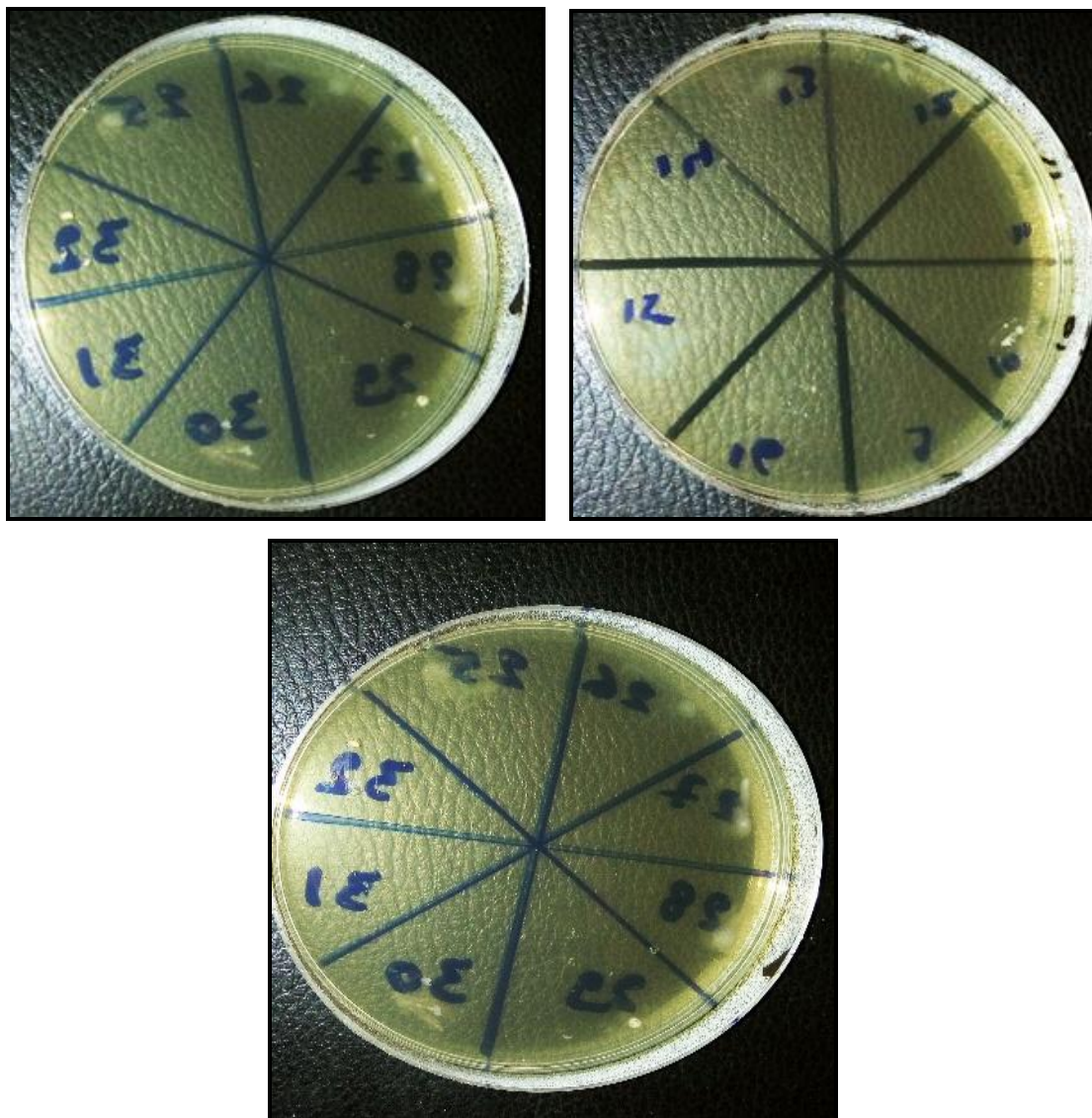
## II.2.2-Caractérisation physiologique des isolats

Les résultats de la caractérisation physiologique sont rapportés dans le tableau 2.

### II.2.2.1-Température de croissance

La gamme de températures explorée varie de 37 à 65°C. Généralement, la croissance de l'ensemble des souches est optimale entre 45°C et 55°C, Selon Perry et Staley (1997) et selon Souza et Martins (2001), ces isolats peuvent être classés parmi les thermophiles.

Résultat de l'influence de la température 65°C sur la croissance des souches est indiqué dans la figure 8.



**Figure 8.** Résultats de l'influence de la Température 65° C sur la croissance des Isolats  
(Photo Originale)

### II.2.2.2- Influence de la concentration en NaCl

Les spectres de salinité enregistrée figurent dans le tableau 2. Toutes les souches étudiées peuvent se développer à des différentes concentrations de NaCl allant de 0% jusqu'à 9% (p/v), dont 63 isolats tolèrent une concentration de 12%, ce qui peut les qualifier selon (DasSarma ,2001) comme des halotolérantes.

L'influence de la concentration de NaCl sur la croissance de nos isolats est représentée dans la figure 9.



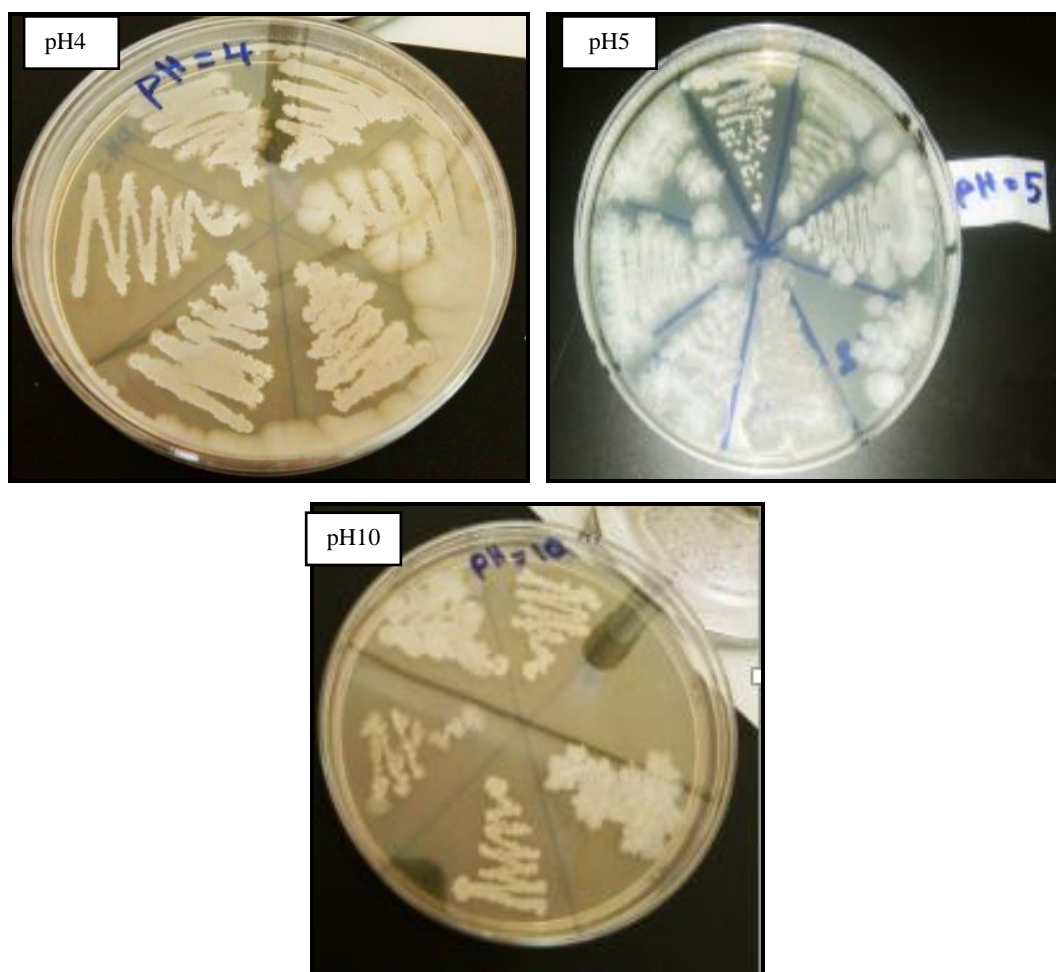
**Figure 9.** Résultats de l'influence de NaCl sur la croissance des souches isolées (Photo Originale)

### II.2.2.3- Influence de pH

L'intervalle de pH permettant la croissance des isolats bactériens variait entre 5 et 10. Ce qui permet de qualifier nos isolats commettant des neutrophiles, acidotolérants et alcalotolérants.

## RESULTATS ET DISCUSSION

L'influence de différentes valeurs de pH sur la croissance de notre souche est représentée dans la figure 10.



**Figure 10.** Résultats de l'influence de pH sur la croissance des isolats  
(Photo Originale)

**Tableau 2 :** Caractères physiologique (Salinité, température et pH) de croissance des souches

Souche	NaCl (%)	pH	T (°C)	souche	NaCl (%)	pH	T (°C)
Bb1	[0 - 12]	[5-9]	[37- 65]	Bb13	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
Bb2	[0 - 9]	[5-9]	[37- 65]	Bb14	[0 - 9]	[5 - 9]	[37- 65]
Bb3	[0 - 9]	[5-10]	[37- 65]	Bb15	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
Bb4	[0 - 9]	[5-9]	[37- 65]	Bb16	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
Bb5	[0 - 9]	[5-10]	[37- 65]	Bb17	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
Bb6	[0 - 9]	[5-9]	[37- 65]	Bb18	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
Bb7	[0 - 12]	[5-9]	[37- 65]	Bb19	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
Bb8	[0 - 12]	[5-9]	[37- 65]	Bb20	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
Bb9	[0 - 9]	[5 - 10]	[37- 65]	Bb21	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
Bb10	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 55]	Bb22	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
Bb11	[0 - 9]	[5 - 10]	[37- 65]	Bb23	[0-12]	[5 - 10]	[37- 65]
Bb12	[0-9]	[5 - 10]	[37- 65]				

## RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 2 (suit) :** Caractères physiologique (Salinité, température et pH) de croissance des souches

Souche	NaCl (%)	pH	T (°C)	souche	NaCl (%)	pH	T (°C)
BE1	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]	BS1	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE2	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]	BS2	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE3	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]	BS3	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE4	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]	BS4	[0 - 9]	[5 - 10]	[45- 65]
BE5	[0 - 9]	[5 - 10]	[45- 65]	BS5	[0 - 9]	[5 - 10]	[37- 65]
BE6	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]	BS6	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE7	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]	BS7	[0 - 9]	[5 - 10]	[37- 65]
BE8	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]	BS8	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE9	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]	BS9	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 55]
BE10	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]	BS10	[0 - 12]	[5 - 10]	[45- 65]
BE11	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]	BS11	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE12	[0 - 9]	[5 - 10]	[37- 65]	BS12	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE13	[0 - 12]	[4 - 10]	[37- 65]	BS13	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE14	[0 - 12]	[4 - 10]	[37- 65]	BS14	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE15	[0 - 12]	[4 - 10]	[37- 65]	BS15	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE16	[0 - 12]	[4 - 10]	[37- 65]	BS16	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE17	[0 - 12]	[4 - 10]	[37- 65]	BS17	[0 - 9]	[5 - 10]	[37- 65]
BE18	[0 - 12]	[4 - 10]	[37- 65]	BS18	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE19	[0 - 12]	[4 - 10]	[37- 65]	BS19	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE20	[0 - 12]	[4 - 10]	[45- 65]	BS20	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE21	[0 - 12]	[4 - 10]	[37- 65]	BS21	[0 - 9]	[5 - 10]	[37- 65]
BE22	[0 - 12]	[4 - 10]	[37- 65]	BS22	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE23	[0 - 12]	[4 - 10]	[37- 65]	BS23	[0 - 9]	[5 - 10]	[37- 65]
BE24	[0 - 12]	[4 - 10]	[37- 65]	BS24	[0 - 9]	[5 - 10]	[37- 65]
BE25	[0 - 12]	[5 - 10]	[45- 65]	BS25	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 55]
BE26	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]	BS26	[0 - 9]	[5 - 10]	[45- 65]
BE27	[0 - 9]	[5 - 10]	[37- 65]	BS27	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE28	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]	BS28	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE29	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]	BS29	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE30	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]	BS30	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]
BE31	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 55]				
BE32	[0 - 12]	[5 - 10]	[37- 65]				

### II.2.3. Caractérisation biochimiques des isolats

Les résultats de la caractérisation biochimique des isolats bactériens sont représentés dans le tableau 3

### II.2.3.1- Recherche de catalase

Les résultats de la mise en évidence de l'enzyme respiratoire catalase ont montré que 75 souches possèdent cette enzyme.



**Figure 11.** Résultat positif de test catalase

### II.2.3.2- Mise en évidence du type respiratoire

La détermination du type respiratoire d'une bactérie consiste en la détermination du rapport qu'a cette bactérie avec l'oxygène.

Les bactéries isolées possèdent trois types respiratoires ; il s'agit de bactéries aéro-anaérobies facultatives ; qui peuvent croître tout au long du milieu, ce type est le plus dominant chez nos isolats, des bactéries aérobies strictes ; qui s'apparaissent seulement au niveau de la surface du milieu, des bactéries micro-aérophiles ; Bactéries qui se développent sous une faible pression d'oxygène.

### II.2.3.3-Utilisation des substrats carbonés

Les résultats d'utilisation de différents substrats testés comme unique source de carbone et d'énergie montrent que la majorité des souches sont capables de dégrader au minimum l'un des substrats tests et 39 d'entre elles présentent un résultat positif pour les trois sucres.

### II.2.3.4-Test Mannitol-Mobilité

Les résultats La fermentation du mannitol ont montré que :

Un virement faible de l'indicateur colorée au jaune a également été noté, Ceci peut s'expliquer par le fait que l'acidification produite par les bactéries est, en général insuffisante face à l'importance du pouvoir tampon du milieu (Joffin et Leyral, 2006)

L'apparition de couleur jaune tout au long de tube pour quelques souches avec une surface rouge donc, il semble que ces souches sont sensibles à l'oxygène (micro-aérophiles).

La plupart des souches sont immobiles, dont 20 souches seulement sont mobiles.

#### **II.2.3.5- Utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron**

Le milieu Triple Sugar Iron (TSI) renseigne sur la capacité à dégrader le glucose, le lactose et/ou le saccharose. D'après les résultats mentionnés dans le tableau 3 ;

La fermentation du glucose est observée chez toutes les souches sauf la souche BB23

L'oxydation du lactose et/ou du saccharose est observés chez la majorité des souches.

Par ailleurs, cette fermentation n'est pas accompagnée d'une production d'H<sub>2</sub>S, ni de CO<sub>2</sub> sauf la souche BS6.

#### **II.2.3.6- L'utilisation du Citrate de Simmon**

Trante cinq (35) Souches sont capables d'assimiler le citrate de simmon comme seule source de Carbone, les autres sont réagies négativement.

#### **II.2.3.7- Recherche de la $\beta$ -galactosidase**

Cinquante-six (56) souches possèdent une  $\beta$ - galactosidase. Le reste des souches présentent un résultat négatif.

#### **II.2.3.8- Recherche de l'uréase**

Cinquante-trois (53) souches se sont révélées uréase positives en se basant sur l'alcalinisation plus ou moins importante du milieu de Christensen les peuvent dégrader l'urée qui est un composé organique et qui peut servir de source d'azote unique aux bactéries possédant une uréase.

#### **II.2.3.9- Production de décarboxylases (LDC, ODC) et Arginine dihydrolase (ADH)**

Sur l'ensemble des souches, cinquante-sept (57) souches sont réagies positivement avec les trois tests. En effet, tous les isolats sont ADH positive dont douze (12) sont ODC négatif et seize (16) sont LDC négatif.

#### **II.2.3.10- Caractérisation du type fermentaire (RM-VP)**

Seules quelques souches ont réagi positivement au test au rouge de méthyle, indicateur de la production d'acides mixtes, et au test du Vosges-Proskauer, indicateur de la production d'acétoïne par fermentation du glucose. Il faut noter que 6 isolats sont positifs aux deux tests.



**RESULTATS ET DISCUSSION**

**II.2.3.11-Test urée- indole**

Les résultats de ce test indiquent la présence d'indole et l'absence de TDA chez toutes les souches.

**Tableau 3 : Caractérisation biochimiques des isolats**

souche	sac/lac	Glu	H2S	Gaz	Mob	Man	Cat	VF	ST	Urée	Ind	TDA	β-gal	ODC	LDC	ADH	VP	RM
BS1	-	+	-	-	-	+	+	μ aer	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BS2	-	+	-	-	+	+	+	Aer Str	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
BS3	P	+	-	-	-	+	+	Aer ana	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
BS4	-	+	-	-	-	f	-	Aer ana	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BS5	-	+	-	-	-	+	+	Aer ana	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
BS6	-	+	-	+	F	+	++	Aer ana	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
BS7	P	+	-	-	-	+	+	Aer Str	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-
BS8	P	+	-	-	+	+	+	Aer ana	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
BS9	P	+	-	-	-	+	+	Aer ana	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
BS10	P	+	-	-	-	+	+	Aer ana	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
BS11	+	+	-	-	-	+	+	Aer ana	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
BS12	P	+	-	-	-	+	+	Aer ana	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
BS13	P	+	-	-	-	+	+	Aer ana	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
BS14	+	+	-	-	-	+	-	Aer ana	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
BS15	P	+	-	-	-	+	+	Aer ana	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
BS16	P	+	-	-	-	+	+	Aer ana	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
BS17	+	+	-	-	-	+	+	μ aer	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
BS18	+	+	-	-	-	+	+	Aer ana	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
BS19	+	+	-	-	-	+	+	Aer ana	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
BS20	P	+	-	-	-	+	-	Aer ana	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
BS21	+	+	-	-	F	+	+	Aer ana	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-
BS22	P	+	-	-	-	+	+	Aer ana	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
BS23	+	+	-	-	F	+	-	Aer ana	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
BS24	P	+	-	-	-	+	-	Aer ana	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
BS25	P	+	-	-	-	+	+	Aer ana	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BS26	P	+	-	-	-	+	-	μ aer	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
BS27	P	+	-	-	-	+	+	Aer ana	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
BS28	+	+	-	-	-	+	-	Aer ana	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
BS29	P	+	-	-	-	+	+	Aer ana	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
BS30	P	+	-	-	-	+	+	Aer ana	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-

**Tableau 3 (suite) : Caractérisation biochimiques des isolats.**

Souche	sac/lac	Glu	H2S	Gaz	Mob	Man	Cat	VF	ST	Uré	Ind	TDA	β-gal	ODC	LDC	ADH	VP	RM
Bb1	+	+	-	-	+	+	+	Aer ana	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
Bb2	-	+	-	-	+	+	+	Aer ana	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Bb3	+	+	-	-	-	-	+	Aer ana	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Bb4	-	+	-	-	+	+	+	Aer Str	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
Bb5	-	+	-	-	+	+	+	Aer ana	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Bb6	+	+	-	-	f	+	-	Aer ana	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
Bb7	-	+	-	-	f	+	+	Aer ana	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Bb8	-	+	-	-	f	+	+	Aer ana	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Bb9	+	+	-	-	+	+	+	Aer ana	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Bb10	+	+	-	-	+	+	+	Aer ana	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Bb11	+	+	-	-	f	+	+	Aer ana	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Bb12	-	+	-	-	f	+	+	Aer ana	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Bb13	+	+	-	-	-	+	+	Aer ana	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Bb14	+	+	-	-	-	+	+	Aer ana	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Bb15	-	+	-	-	f	+	+	Aer ana	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Bb16	-	+	-	-	f	+	+	Aer ana	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
Bb17	+	+	-	-	+	+	+	Aer ana	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Bb18	-	+	-	-	+	+	+	Aer ana	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Bb19	-	+	-	-	+	+	-	Aer ana	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Bb20	-	+	-	-	+	+	+	Aer ana	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Bb21	-	+	-	-	+	+	+	Aer ana	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
Bb22	-	+	-	-	-	+	+	Aer ana	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
Bb23	-	-	-	-	f	+	+	Aer ana	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-

## RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 3 (suite) : Caractérisation biochimiques des isolats.**

Souche	sac/lac	Glc	H2S	Gaz	Mob	Man	Cat	VF	ST	Urée	Ind	TDA	β-gal	Odc	Ldc	Adh	VP	RM
BE1	+	+	-	-	+	+	-	Aer ana	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BE2	-	+	-	-	-	+	+	Aer str	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BE3	+	+	-	-	+	+	+	Aer ana	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BE4	+	+	-	-	+	+	+	Aer ana	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BE5	+	+	-	-	-	f	-	Aer ana	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
BE6	+	+	-	-	-	+	+	Nd	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
BE7	+	+	-	-	+	+	+	Aer ana	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BE8	+	+	-	-	f	+	+	Aer ana	-	+	+	-	ND	-	-	+	-	+
BE9	+	+	-	-	-	+	+	Aer str	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
BE10	+	+	-	-	-	+	+	Aer ana	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BE11	-	+	-	-	-	+	+	Aer ana	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BE12	+	+	-	-	-	-	+	Aer ana	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
BE13	+	+	-	-	f	+	+	Aer ana	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BE14	+	+	-	-	f	+	+	Aer ana	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
BE15	+	+	-	-	-	f	+	Aer ana	-	-	+	-	+	+	+	+	*	+
BE16	P	P	-	-	f	+	+	Aer ana	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BE17	+	+	-	-	f	+	+	Aer ana	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BE18	+	+	-	-	-	+	+	Aer ana	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BE19	+	+	-	-	+	+	+	Aer ana	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
BE20	-	+	-	-	Nd	Nd	+	Aer ana	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
BE21	+	+	-	-	F	+	+	Aer ana	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
BE22	+	+	-	-	+	+	+	Aer ana	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
BE23	-	F	-	-	f	+	+	Aer ana	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BE24	+	+	-	-	-	+	+	Aer ana	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
BE25	-	+	-	-	-	+	+	Aer str	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
BE26	-	F	-	-	-	+	+	Aer str	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BE27	-	-	-	-	-	+	-	Nd	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
BE28	-	F	-	-	-	+	+	Aer str	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
BE29	+	+	-	-	f	+	+	Aer str	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BE30	+	+	-	-	-	+	+	μ aer	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
BE31	+	+	-	-	F	+	+	Aer ana	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BE32	F	+	-	-	-	+	+	Aer ana	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+

Sac /Lac : Saccharose/Lactose. Glc : Glucose. Mob : Mobilité. Man : Mannitol. Cat : Catalase. ST : Citrate de Simmon. β-gal : β-galactosidase. Ind : indole . RM : rouge de méthyl. VP : Vosges-Proskauer. Aer ana fac : Aero-anaerobie facultatif. Aer str : Aérobie strict. μ aer : micro-aérophile . P : partielle. f : faible

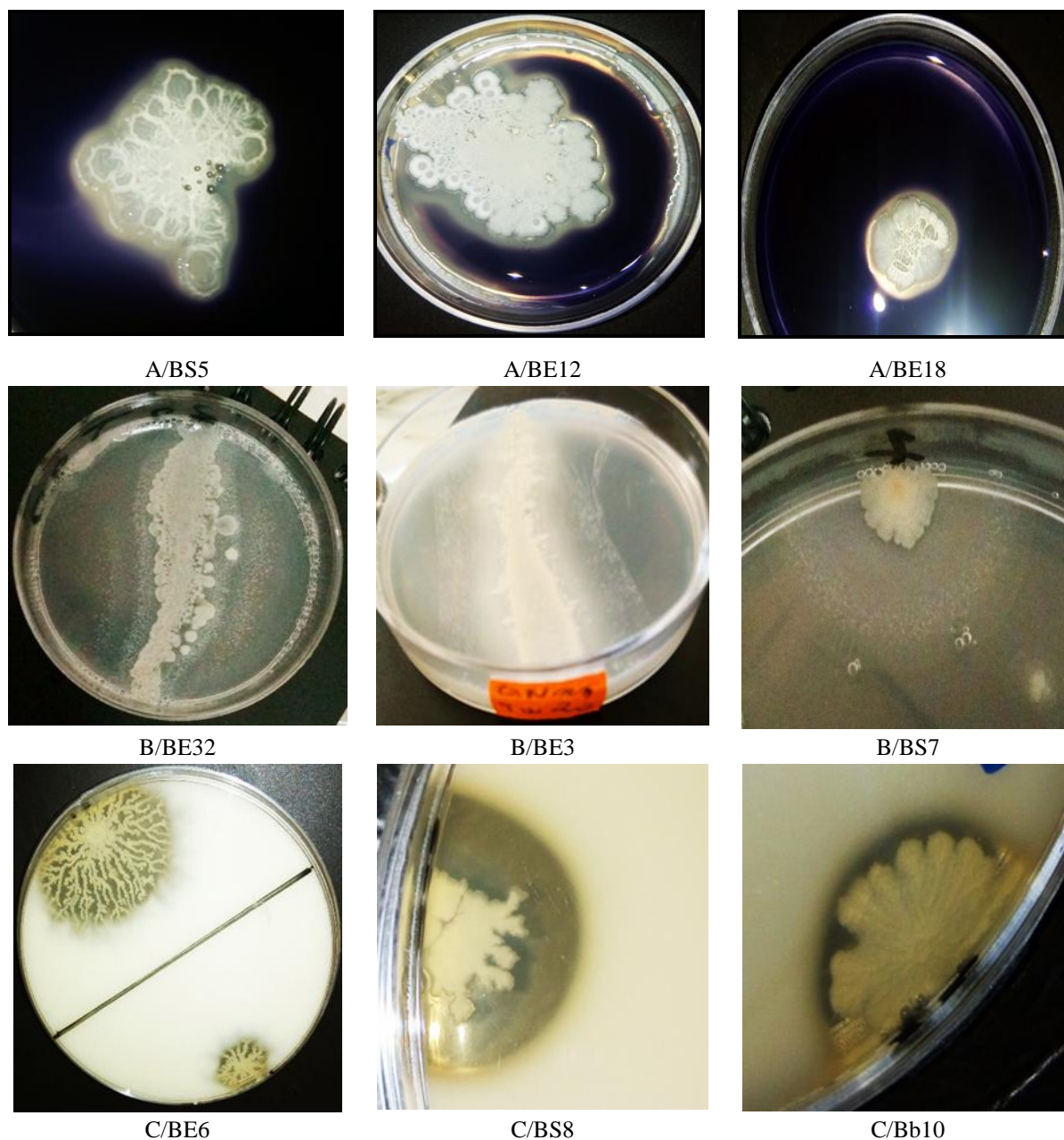
**Tableau 4 : Utilisation des substrats carbonés par les isolats**

Souche	Mal	Gal	Xyl	Souche	Mal	Gal	Xyl	Souche	Mal	Gal	Xyl
BE1	+	-	-	BE30	+	-	-	BS27	+	+	+
BE2	+	+	-	BE31	+	-	-	BS28	+	+	+
BE3	+	+	-	BE32	+	-	+	BS29	+	+	+
BE4	+	+	-	BS1	+	+	P	BS30	+	+	*
BE5	+	-	-	BS2	+	+	-	Bb1	+	+	+
BE6	+	-	-	BS3	+	+	P	Bb2	-	-	+
BE7	+	+	-	BS4	+	+	+	Bb3	+	+	-
BE8	+	+	+	BS5	+	+	P	Bb4	+	+	+
BE9	+	-	+	BS6	+	+	+	Bb5	+	+	+
BE10	+	-	-	BS7	+	+	P	Bb6	+	+	+
BE11	+	+	-	BS8	+	+	+	Bb7	+	-	+
BE12	+	-	-	BS9	+	+	+	Bb8	+	+	-
BE13	+	-	-	BS10	+	+	+	Bb9	-	+	+
BE14	+	+	+	BS11	+	+	-	Bb10	+	-	+
BE15	+	+	-	BS12	+	+	+	Bb11	+	-	+
BE16	+	+	+	BS13	+	+	+	Bb12	+	-	+
BE17	+	+	+	BS14	+	+	+	Bb13	+	+	+
BE18	+	-	-	BS15	+	-	+	Bb14	+	-	+
BE19	+	-	-	BS16	+	+	+	Bb15	+	+	+
BE20	+	-	-	BS17	+	+	-	Bb16	+	-	+
BE21	+	-	-	BS18	+	+	+	Bb17	+	+	+
BE22	+	+	-	BS19	+	+	+	Bb18	+	+	+
BE23	+	+	-	BS20	+	+	+	Bb19	-	-	+
BE24	+	+	+	BS21	+	+	+	Bb20	-	-	+
BE25	+	+	+	BS22	+	+	+	Bb21	+	+	+
BE26	+	-	-	BS23	+	+	+	Bb22	+	+	+
BE27	+	-	-	BS24	+	+	+	Bb23	+	+	+
BE28	+	+	-	BS25	+	+	+				
BE29	+	-	-	BS26	+	+	+				

Xyl : Xylose, Gal : Galactose, Mal : Maltose

### II.3-Profil des activités hydrolytiques extracellulaires des souches isolées

Un screening des activités amylolytiques, protéolytiques et lipolytiques a été effectué, la présence de ces activités a été détectée en utilisant les substrats, amidon, gélatine, caséine, tween 20 et tween 80 respectivement (Figure 12). Les résultats présentés dans le tableau 4.



**Figure 12.** Exemples d'activités hydrolytiques détectées. (Photo Originale)

- A. Hydrolyse de amidon ;
- B. B. Hydrolyse de tween 20 / 80 ;
- C. C. Hydrolise la caséine.

## RESULTATS ET DISCUSSION

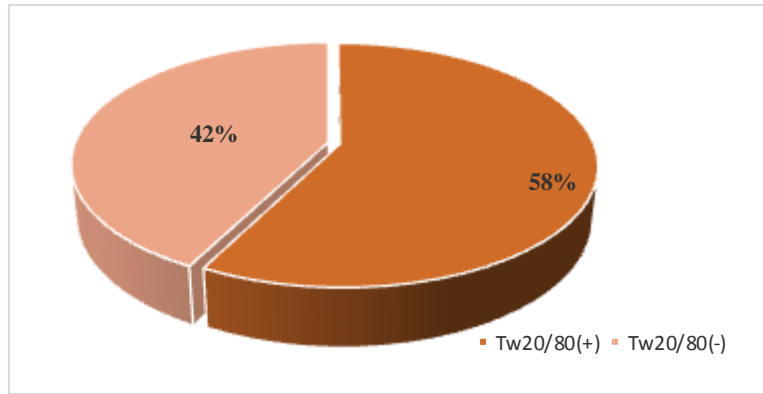
**Tableau 5:** Activité hydrolytiques des souches isolées.

Souche	Ami	Gel	Cas	Tw20	Tw80	Souche	Ami	Gel	Cas	Tw20	Tw80	Souche	Ami	Gel	Cas	Tw20	Tw80
BE1	+	+	+	-	+	BE30	+	+	+	+	+	BS27	-	+	-	+	-
BE2	+	+	+	-	+	BE31	+	+	+	+	-	BS28	+	+	+	-	-
BE3	+	+	-	+	+	BE32	+	+	-	+	+	BS29	+	+	+	-	-
BE4	+	+	+	+	+	BS1	+	+	+	-	-	BS30	+	+	+	-	-
BE5	+	+	-	-	-	BS2	+	+	+	-	-	Bb1	+	+	+	+	+
BE6	+	+	+	+	+	BS3	+	+	+	-	-	Bb2	+	+	+	-	+
BE7	+	-	+	+	+	BS4	+	+	+	+	-	Bb3	+	-	+	-	+
BE8	+	-	-	+	+	BS5	+	+	-	-	-	Bb4	+	+	+	-	+
BE9	+	+	+	-	-	BS6	+	+	+	-	-	Bb5	+	+	+	+	+
BE10	+	+	+	+	-	BS7	-	+	+	-	+	Bb6	+	+	+	+	+
BE11	-	-	-	+	+	BS8	+	+	+	-	-	Bb7	+	+	+	+	+
BE12	+	+	-	+	+	BS9	+	-	+	-	-	Bb8	+	+	+	+	+
BE13	+	+	+	-	+	BS10	+	-	+	-	-	Bb9	+	+	+	-	+
BE14	-	-	+	+	+	BS11	+	+	+	-	-	Bb10	+	+	+	+	+
BE15	+	+	+	+	+	BS12	+	+	+	-	-	Bb11	+	+	+	-	+
BE16	-	+	+	+	+	BS13	-	+	+	-	-	Bb12	+	+	+	+	+
BE17	+	+	+	+	+	BS14	+	+	+	-	-	Bb13	+	+	+	+	-
BE18	+	+	+	+	+	BS15	+	+	+	+	-	Bb14	+	+	+	-	+
BE19	+	+	+	+	+	BS16	+	+	+	-	-	Bb15	+	+	+	+	-
BE20	+	-	+	+	+	BS17	+	-	-	-	-	Bb16	+	+	+	+	+
BE21	+	+	+	+	+	BS18	+	-	+	-	-	Bb17	+	+	+	+	-
BE22	-	-	+	+	+	BS19	-	-	+	-	-	Bb18	+	-	+	+	+
BE23	-	+	-	+	+	BS20	+	+	+	-	-	Bb19	+	+	+	-	+
BE24	+	-	+	+	-	BS21	+	+	+	-	+	Bb20	+	+	+	-	+
BE25	+	+	+	+	+	BS22	+	+	+	+	-	Bb21	+	+	+	-	-
BE26	+	+	+	+	+	BS23	+	+	+	+	+	Bb22	+	+	+	-	+
BE27	+	+	+	+	+	BS24	+	+	+	+	-	Bb23	+	+	+	-	+
BE28	+	+	+	+	+	BS25	+	+	+	-	-						
BE29	+	+	+	+	+	BS26	+	+	+	+	-						

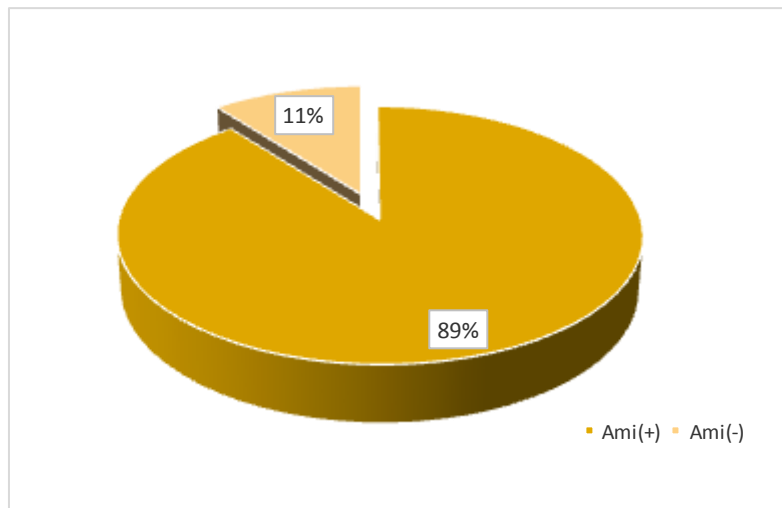
Activité amyloлитique : Ami : Amidon.

Activité proteolitique : Cas : Caséine, Gél : Gélatine.

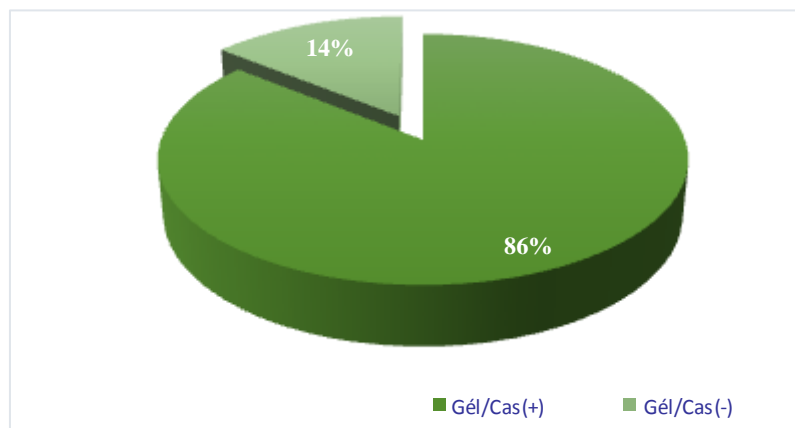
Activité lipolytique : TW20 : Tween 20, TW80 : Tween 80.



**Figure 13.** Pourcentage des souches possédant une activité lipolitique



**Figure 14.** Pourcentage des souches possédant une activité amylolytique

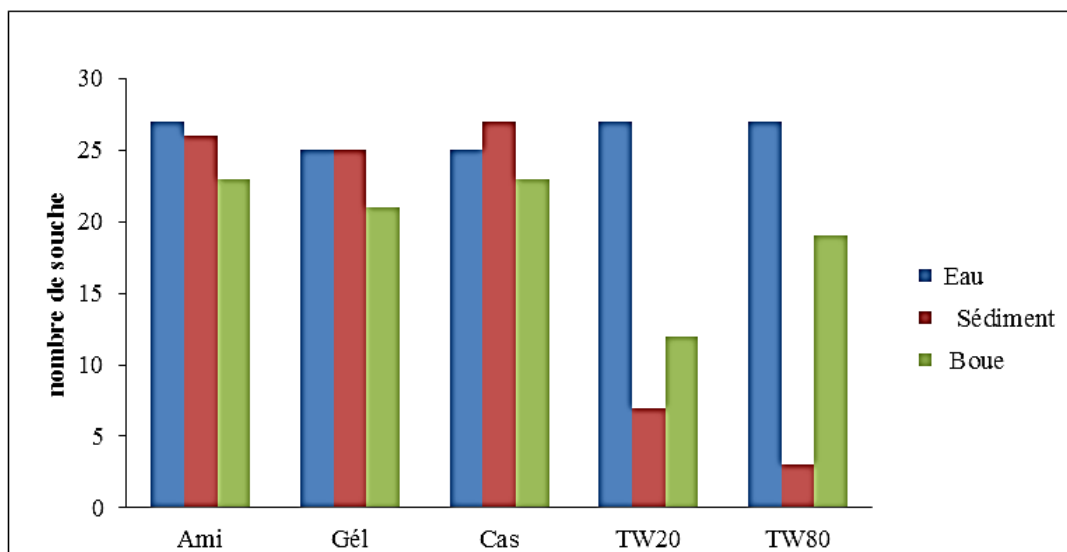


**Figure 15.** Pourcentage des souches possédant une activité protéolytique

Nos résultats ont montré que toutes les souches possédaient au moins deux activités hydrolytiques dominées par les activités protéolytiques et amylolytique (Figures 13, 14 et 15).

Touts les isolats possèdent une activité hydrolytique très remarquable, on note que 89% des souches sont capables d'hydrolyser l'amidon, ce qui signifie que ces dernières possèdent une amylase, le profile protéolytique a montré que 86 % des souches ont la capacité de dégrader la caséine et la gélatine. Les tweens 20 et 80 sont hydrolysés par 56% de l'ensemble des souches.

La comparaison des profils de production enzymatique selon la provenance des isolats est présentée dans la figure 12.



**Figure 16.** Effectifs des souches ayant pu hydrolysées les substrats tests, répartis selon leurs différents niches d'isolement.

Les activités amylolytiques et protéolytiques semblent que sont les plus dominantes chez l'ensemble des souches; avec une particularité que les souches isolées à partir de boue présentent, une activité amylolytique plus élevée en comparant aux celles isolées d'eau et de sédiment, concernant le profile lipolytique, les isolats d'eau sont les plus dominants.

Selon Bertoldo et Antranikian (2002), les bactéries thermophiles produisent une gamme d'enzymes hydrolytiques (protéase, cellulase, amylase, glucosidase, glucoamylase, pullulanases, cyclodextrine glycosyltransferase). Elles sont également capables de dégrader d'autres polysaccharides telsque le glycogène fourni par des cellules animales ou microbiennes .

De nombreuses études en montrant que les microorganismes thermophiles sont la meilleure source d'enzymes thermostables telles que les protéases, les lipases, les amylases et les estérases (Salameh et Wiegel, 2007; Turner, 2007 ; Stathopoulou *et al.*,2013). Ces

enzymes thermostables sont très pratiques pour les applications industrielles, car ils sont généralement stables à haute température et dans des solvants organiques tels que le toluène, l'hexane, l'acétate d'éthyle. Ces enzymes offrent plusieurs avantages dans la zone d'utilisation. Ils augmentent la solubilité du substrat, le taux de diffusion et réduisent la viscosité et le risque de contamination (Sifour et al., 2010).

#### **II.4-Activité antimicrobienne**

La recherche de l'activité antimicrobienne est effectuée sur dix isolats sélectionnés et a été réalisée par la technique des stries croisés vis-à-vis deux bactéries et une levure ; les résultats sont représentés dans le tableau 6.

**Tableau 6 :** Résultats de l'activité antimicrobienne de dix isolats vis-à-vis les souches tests

Souches	BS8	BS19	BS16	BS20	BS29	BS16	BE9	BE13	BE18	BE19	BE26
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
<i>E.coli</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>S.aureus</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>Candida</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-

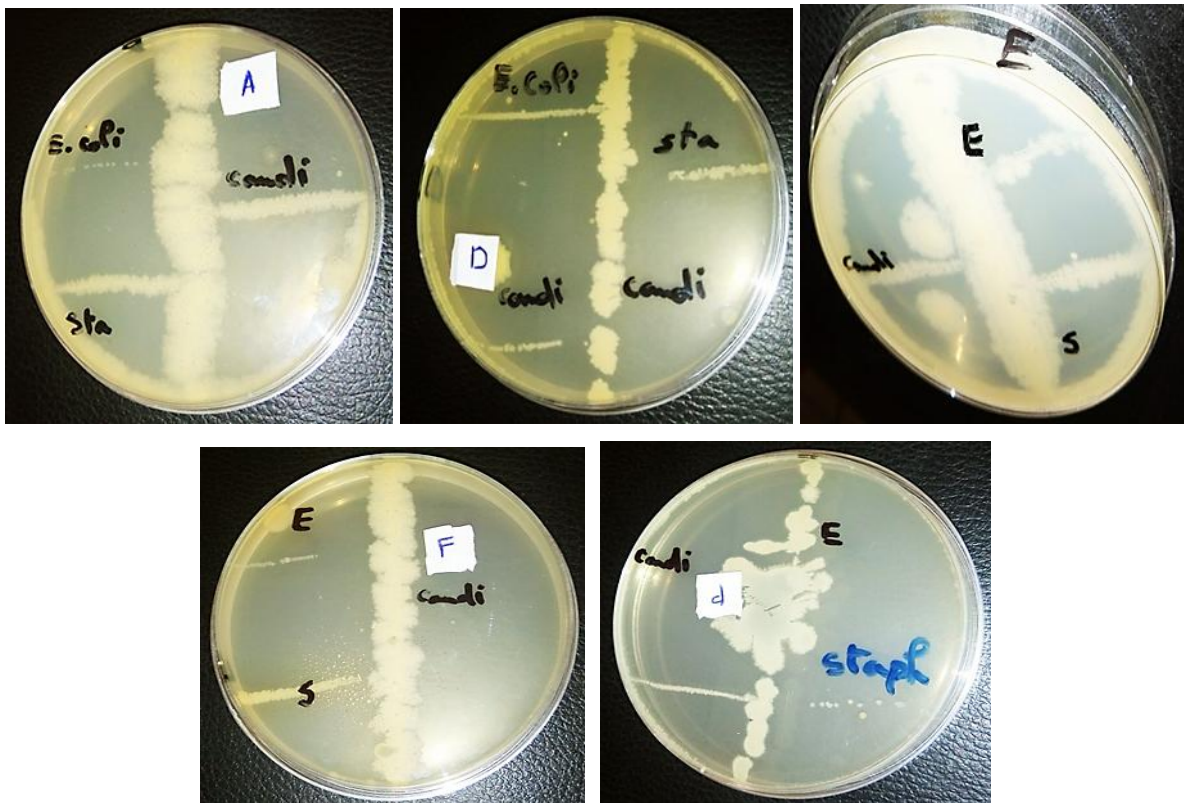
Parmi les 10 souches testées, nous avons quatre souches (BS8, BS16, BS20 et BE19) présentent une activité antimicrobienne vis-à-vis d'au moins l'une des souches cibles (tableau6)

La souche BS8 possède un pouvoir inhibiteur uniquement contre *Escherichia coli*, tandis que les trois souches (BS16, BS20 et BE19) sont actives à la fois contre deux germes test ; la souche BE19 présente une activité antibactérienne et aucune activité antifongique n'a été détectée alors que les souches BS20 et BS16 ont un large spectre d'activité à la fois sur les bactéries et les champignons.

Ces résultats confirment les résultats de plusieurs études qui affirment la capacité de microorganismes thermophiles isolées de sources chaudes terrestre pour leur production de substances antibactériennes actives contres des microorganismes pathogènes (Awais *et al.*, 2007; Syed et al. 2009 ; Yakhlef *et al.*, 2012).

Gayathriet *et al.*, (2011) ont isolé des thermophiles à partir de différents échantillons de sol de la sebkha de Kenadsa et confirment que les souches isolées à partir de ces milieux extrêmes possèdent un pouvoir antimicrobien remarquable par rapport à leurs homologues isolés à partir des milieux naturels normaux (rhizosphère, eau douce, sol floristique, ...etc.).

L'activité antimicrobienne de nos isolats vis-à-vis les germes tests est indiqués dans la figure 17.



**Figure 17.** Résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis *E. coli*, *S. aureus* et *Candida albicans*(Photo Originale)

### II.5-Identification des isolats

L'identification des isolas a été faites selon Bergy's manuel (2009), elle est basée sur des critères physiologiques (l'évaluation de la tolérance au NaCl, pH et température), des critères morphologiques (l'aspect macroscopique et microscopique) et les critères biochimiques suivi par évaluation de profil enzymatique.

Nos résultats montrent que les isolats partagent quelques critères en commun :

- ✓ Colonies avec aspect compact, sec, lisse ou rugueux avec un mycélium développé ou non, d'une couleur jaunâtre et/ou blanchâtre ;
- ✓ Gram + ; aérobies ou aéro-anaérobies ;
- ✓ La température de croissance est de 37 à 65 °C ;
- ✓ Le spectre de pH est de 5 à 10 ;
- ✓ La tolérance de NaCl atteindre jusqu' à 12 % p/v ;
- ✓ Elles ont la capacité de dégrader plusieurs substrats : caséine, gélatine, tween 20, tween 80 et amidon.



## RESULTATS ET DISCUSSION

D'après ces critères, nos isolats semblent que sont des actinomycètes et nous pouvons les classés selon Bergey's manuel en huit genres : *Streptomyces* sp. (40 souches), *Micromonospora* sp. (12 souches), *Nocardia* sp. (9 souches), *Thermoactinomyces* sp (17 souches), *Shimazuella* sp. (4 souches), *Mechercharimyces* sp. (3 souches), *Planifilium* sp (3 souches) et *Laceyella* sp (18 souches).

**Tableau 7 :** Tableau identification des isolats selon Bergey's manuel et autres

Isolats	Critères selon Bergey's Manuel 2009	Espèce identifié
BE4, BE10, BE13, BE15, BE17, BE18, BE21, BE25, BE26, BE27, BE28, BE29, BE30, BE31, BS23 et BS26. BE1, BE2, BE5, BE7, BS10, BE25, BS11, BS17, Bb1, Bb2, Bb4, Bb5, Bb6, Bb7, Bb8, Bb9, Bb10, Bb11, Bb12, Bb14, Bb16, Bb19, Bb22 et Bb23.	Un bagage enzymatique très puissant : Dégrade la caséine, gélatine l'amidon et les lipides.	<i>Streptomyces</i> sp.
BS8, BS9, BS12, BS14, BS16, BS20, BS25 et BS27, Bb13, Bb15, Bb17, Bb21.	Faible dégradation de l'amidon et de lipide. Gram positif. Colonie blanche. Température optimale 55°C.	<i>Micromonospora</i> sp.
BE3, BE8, BE11, BE17, BE32, BS15, BS22, BS24, BS26.	Faible pouvoir enzymatique voir négligeable. Dégrade les lipides.	<i>Nocardia</i> sp.
BE10, BE14, BE22, BE23, BS19 BS1, BS2, BS4, BS5, BS6, BE2, BE11, BE20, BE23, BE25 et BE26	Dégrade la caséine, la gélatine et non pas l'amidon.	<i>Thermoactinomyces</i> sp.
BE7, BE20, BE24 et BS18.	Dégrade la caséine et l'amidon Optimale 37°C.	<i>Shimazuella</i> sp.
BE16, BS7 et BS13.	Dégrade que la gélatine et la caséine.	<i>Mechercharimyces</i> sp.
BS28, BS29 et BS30.	Dégrade les caséines et l'amidon Température optimale 63°C.	<i>Planifilium</i> sp.
Bb3, Bb8, BS3, BS5, BS7, BS17, BS21, BE5, BE6, BE9, BE12, BE19, BE20, BE21, BE22, BE25, BE28 et BE30.	β-galactosidase négatif dégrade caséine et gélatine température optimale 48-55 °C	<i>Laceyella</i> sp.

# *Conclusion*

### CONCLUSION

Les microorganismes thermophiles autochtones des environnements chauds tels que les sources thermales terrestres possèdent des capacités d'adaptation moléculaires intéressantes. Ils sont très recherchés par différentes industries à cause de leurs propriétés qui dépassent celles de leurs contreparties mésophiles.

Dans ce modeste travail, un isolement des souches thermophiles a été effectué à partir de trois niches écologiques (eau, sédiment et boue) provenant d'une station thermale, suivi d'un essai d'identification et d'estimation des potentialités enzymatiques et antimicrobiennes .

En effet, 85 souches bactériennes thermophiles ont été obtenus sur six milieux de culture, la caractérisation morphologique a révélé que la plupart des souches présentent des critères de sélection des Actinomycètes généralement de forme bâtonnets à Gram positif capables de former des spores.

L'étude physiologique nous a révélé qu'il s'agit de souches thermophiles modérés légèrement halotolérantes, et qui tolèrent des pH acides et alcalins. Elles sont biochimiquement différentes mais partagent quelques caractères.

Sur le plan de la production d'enzymes extracellulaire, il est intéressant de signaler que la majorité des isolats possèdent des activités hydrolytiques combinées, d'où leur importance biotechnologique.

Les résultats d'étude morphologique, physiologique et propriétés hydrolytiques, nous a permis de classer nos isolats en huit genres : *Streptomyces* sp, *Micromonospora* sp, *Nocardia* sp, *Thermoactinomyces* sp, *Shimazuella* sp, *Mechercharimyces* sp, *Planifilium* sp et *Laceyella* sp.

En termes de pouvoir antimicrobien, un screening primaire par la technique de stries croisées a révélé que certaines souches possèdent un pouvoir inhibiteur contre les bactéries Gram positif et à Gram négatif et aussi contre la levure.

L'objectif de ce travail a été en grande partie atteint, bien que certains paramètres ou certaines techniques prévues à effectuer n'aient pas pu être réalisées en raison de non disponibilité de matériel et des moyens.

Cette étude n'est qu'un tout premier essai de caractérisation des bactéries thermophiles en particulier les actinomycètes producteurs de composés extracellulaires de valeur biotechnologique très importante.

## CONCLUSION

---

La contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne et la mise en évidence d'activités enzymatiques extracellulaires des souches a donné des résultats très encourageants qui devront être complétés par des études supplémentaires et nécessaires afin d'identifier ces composants.

Par conséquent, ce travail ouvre des perspectives diverses :

- L'étude géotypique des souches.
- L'extraction et l'analyse quantitative et qualitative de molécules antibactérienne produites par les souches isolées.
- La purification et l'analyse des enzymes produits par les isolats pour l'utilisation en biotechnologie.

# *Références Bibliographiques*

RÉFÉRENCÉES BIBLIOGRAPHIE

**Antranikian, G. (2009).** Extremophiles and biotechnology in: Encyclopedia of life sciences (ELS). John Wiley & Sons. Ltd: Chichester; P: 1-5.

**Awais M., Aamer A. S., Abdul H. and Fariha H. (2007).** Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by bacillus sp. Pak J. Bot., 39(4): 1303-1312

**Bastide, A., M. de Méo., M. Andriantsoa, M. Laget et G. Duménial. (1986).** isolement et sélection de souche d'actinomycètes productrice de substance antifongiques de structure non-polyénique. laboratoire de microbiologie . faculté de pharmacie . MIRCEN journal , 1986, 2, p 453-466

**BELAIDI I., SAHOUR F. (2015).** Etude de l'activité antibactérienne et antifongique d'une collection d'actinomycètes. Mémoire de Master université des Frères Mentouri, Canstantine 41P

**Bhalla A., Capalash N., Kaur P., Sharma P., Singh G. (2011).** Laccase from prokaryotes: A new source for an old enzyme, Reviews in Environmental Science and Biotechnology, vol. 10, no.4, pp. 309–326

**Brock T. D., (1965).** The road to Yellowstone-and Beyond. *Annual Review of Microbiology* ; 49:1-28.

**CALTEAU A. (2005).** Relations évolutives entre les bactéries et les archées hyperthermophiles. Thèse de doctorat en microbiologie, université de Bretagne occidentale, France. P:21-23

**Das Sarma S. (2001).** Halophiles. Encyclopedia of Life Sciences : 1-9

**De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. et Whitman W. B., (2009).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition., Volume Three, The Firmicutes. Springer, New York, USA. 1

**Franzetti B. (2019).** Microbes des environnements extrêmes . Encyclopédie de l'environnement . en ligne ISSN 2555 - 0950 [2] Alber S., Vossenberg J., Driessen A. and Konings W., (2001). Bioenergetics and solute up take under extreme conditions. Extremophiles. 5: 285-294.

- Gayathri A; Madhanraj P; and Panneerselvam A. (2011).** Diversity, Antibacterial Activity And Molecular Characterization of Actinomycetes Isolated From Salt Pan Region of Kodiakarai, Nagapattinam DT. Asian J. Pharm. Tech. Vol: 1. N° 3. Pp: 79-81
- Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W. A., Krieg N. R. (1994).** Methods for General and
- Ghassemi F., Jakeman A. J. and Nix H. A. 1995.** Salinisation of Land and Water Resources. (Eds.). Wallingford Oxon: CAB International
- 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. Université Mentouri, CONSTANTINE. 136p
- Gonzalez C., Gutierrez C., Ramirez C. (1978).** *Halobacterium vallismortis* sp. nov. An amylolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol* 24: 710-715
- Gregoire P., Fardeau M.L., Guasco S., Bouanane A., Michotey V., Bonin P., Duborg K., Gambar J., Ollivier B. (2009).** Les micro-organismes de l'extrême. La Presse thermale et climatique. Vol(146): 49-61.
- Guiraud J.P.,( 1998).** *Techniques d'analyses microbiologiques : Microbiologie alimentaire.* Dunod,Paris, France
- Harley J.P., Prescott L.M. (2002).** Laboratory Exercises in Microbiology, 5th Ed., 449P
- Holden J.F. (2009).** Extremophiles: Hot Environments in Encyclopedia of microbiology,
- Horikoshi K., Bull A.T. (2011).** Prologue: definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emerging fields of extremophiles in: Extremophiles Handbook. Ed. Horikoshi K. P: 1-12. Springer.
- Joffin J.N., Leyral G. (2006).** *Microbiologie technique*, tome 1 : dictionnaire des techniques 4ème édition. 361P.
- Macelroy RD.(1974).**Some comments on evolution of extremophiles. Biosystems. vol(6):74-75.
- Nazina T.N., Tourova T.P., Poltaraus A.B., Novikova E.V., Grigoryan A.A., Ivanova A.E., Lysenko A.M., Petrunyaka V.V., Osipov G.A., Belyaev S.S., Ivanov M.V. (2001).**

Taxonomic study of aerobic *thermophilic bacilli*: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**:433-446.

**Quérellou, J. Guézennec, J. (2010).** Biotechnologie des extrêmophiles. Ed. Tech. Ing. BIO580; P : 1-13

**Roxana C., Simona M., Gabriela P., Lucia D., Kamekura M., Mădălin E. (2009).** Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal, *5*: 4458-4466

**Salameh M., Wiegel J. (2007).** Lipases from extremophiles and potential industrial application. *Adv. Appl. Microbiol.*, **61**, 253-283 158.

**Souza A., N. and Martins M. L. (2001).** Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, **vol. 32**. 1517 p.

**Stathopoulou P.M. , Savvides A. L., A.D. Karagouni, and Hatzinikolaou D.G. (2013).** Unraveling the Lipolytic Activity of Thermophilic Bacteria Isolated from a Volcanic Environment. *BioMed Research International Bio. Article ID 703130*.

**Stetter K.O. (1996).** Hyperthermophilic prokaryotes. *F.E.M.S. Microbiol., Rev.*, **18**:149-

**Syed A. M., Safia A. and Abdul H. (2009).** Antibiotic production by thermophilic bacillus specie SAT-4. *Pak. J Pharm. Sci.*, Vol. 22, No.3, pp. 339-345. techniques 4ème édition. 361P

**Turner P., Mamo G., Karlsson E.N. (2007).** Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb. Cell Fact.*, **15**, 6-9 3rd Ed., Schaechter M. P: 127-146. Elsevier.

**Valan Arasu M., Duraipandiyan V., Agastian P., Ignacimuthu S. (2009).** In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from western Ghats rock soli. *Journal de microbiologie Médical*. Vol 19 : 22-28

**Wiegel, J. Canganella, F. (2001).** Extreme Thermophiles in; Encyclopedia of life sciences. Wiley Ed. 12P



## RÉFÉRENCÉES BIBLIOGRAPHIE

---

**Yakhlef W., et Darbouche A. (2012).** Metabolic Diversity of Thermophilic Dacteria from Hot Springs in Algeria. *Journal Academica* Vol. 2(1), pp. 57-65

# *Annexes*

## Annexes

---

### Annexe 01

**Tableau 1 :** Caractérisation physiques et chimiques de Hammam Bouhanifia

Paramètres	Paramètres physiques		Paramètres chimique					
	T (°C)	pH	Ca <sup>+2</sup> (mg/l)	Mg <sup>+ 2</sup> (mg/l)	Cl <sup>-</sup> (mg/l)	Na <sup>+</sup> (mg/l)	K <sup>+</sup> (mg/l)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)
Valeurs	42	6,5	200	95	390	331	46	0,03

## Annexes

### Annexe 02 :

**Tableau 1 :** Composition des milieux d'isolement et de purification des souches

Milieux (pH 7,4±0,2)	M1	M2	M3	M4	Bouillon d'enrichissement
Constituants	Quantité(g)				
NaCl	0,2		0,5		0,2
NaNO3				0,2	
MgSO4.7H2O				0,05	
KCl				0,05	
Fe2(SO4). 3H2O				0,001	
KH2PO4				0,014	
K2HPO4				0,12	
Amidon soluble		0,1			
Extrait de levure	0,4	0,1	0,25	0,002	0,4
Peptone	0,5	0,5	0,5		0,8
Extrait de viande			0,1		
Agar	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Eau distillée (ml)	100	100	100	100	100

L'eau distillée a été remplacée par de l'eau de source filtrée pour les milieux 1, 2, 3 et 4 pour l'isolement des souches thermophiles de sédiment.

Milieu 1, milieu 2, Milieu 3(Gélose nutritive), milieu 4 (Atlas, 2005).

**Tableau 2 :** Milieux de culture utilisés pour la recherche des activités hydrolytiques extracellulaires,:

Milieux	Amylase	Tween20	Tween80
Constituants	Quantité (g)		
NaCl	0,2	0,2	0,2
Amidon soluble	1		
Tween20		1	
Tween80			1
Extrait de levure	0,2	0,1	0,1
Peptone	0,5	0,2	0,2
Agar	1,5	1,5	1,5
Eau distillée (ml)	100	100	100

**Milieux d'activités protéiques**

➤ **Gélose au lait**

Préparation 1

Lait écrémé poudre .....05g

Eau distillée .....50ml

Préparation 2

Agar.....01g

Eau distillée .....50ml

Stérilisation séparément par autoclave à 121°C / 20min.

➤ **Gélatine**

Gélatine.....33g

Eau distillée .....100ml

## Annexes

**Tableau 3 : Milieux de caractérisation biochimiques**

Milieux	Citrate de Simmons	Mannitol-Mobilité	TSI	Viande Foie VF	Clark et Lubs	Urée de Christensen	Eau peptonée
Ph	7.1 ±0.2	7.6 ±0.2	7.4 ±0.2	7.6 ±0.2	7.5 ±0.2	6.8 ±0.2	7.4 ±0.2
Constituants	Quantité g/ml						
NaCl	0,5		0,5			0,5	0,2
Ethanol							
Citrate de sodium	0,1						
Citrate d'ammoniaque Ferrique			0,003				
Bleu de bromothymol	0,008						
Rouge de phénol		0,004	0,0025			0,0012	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1						
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>						0,2	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1				0,5		
KNO <sub>3</sub>		0,1					
NH <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1						
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>			0,03				
Glucose			0,1	0,5	0,5	0,1	
Saccharose			1				
Lactose			1				
Mannitol		0,75					
Peptone de caséine		1					
Urée						2,4	
Extrait de viande				1			
Extrait de levure				1			0,5
Peptone			2	2	0,5	0,1	0,1
Extrait de boeuf			0,3				
Agar	1,5	0,35	1,2	1,5		2	
Eau distillée (ml)	100	100	100	100	100	100	100

➤ **Préparation de MEVAG : pH (25°C) final= 7,0±0.2**

Macération de viande (500 g /l).....50ml

KCl.....05g

Rouge de phénol (solution aqueuse à 0,2) .....10ml

Eau distillée .....1000ml

**Annexe 3 :**

➤ **Réactifs**

**Réactifs de la coloration de Gram**

- Solution de violet de gentiane : 1g de violet de gentiane ; 10ml d'alcool éthylique à 95% ; 2g de phénol ajoutés à 100ml d'Eau distillée ;
- Solution de lugol de Gram : 1 d'iodure de potassium ; 1gd'iode ajoutés à 300 ml d'eau distillée ;
- Solution de fuschine de ziehl (Guiraud et Galzy, 1980). 1 g de Fuschine ; 10ml d'alcool éthylique à 95% ; 5g de phénol ajoutés à 100ml d'eau distillée.

**Réactif de Barritt (réaction de Vogues Proskauer)**

Solution 1: 6 g d' $\alpha$ -naphthol dans 100 ml d'alcool éthylique à 95%,

Solution 2: 40 g d'hydroxyde de potassium dans 100 ml d'eau (à conserver au réfrigérateur).

➤ **Réactif au rouge de méthyl (Recherche d'acides) (pour 500 ml).**

0.1 g de rouge de méthyle dans 300 ml d'alcool éthylique à 95%, compléter jusqu'à 500 ml avec de l'eau distillée.

➤ **Réactif de Kovacs (pour le test d'indole).**

150 ml de N-amyl/isoamyl alcool ; 50 ml d'acide

Hydrochlorique concentré et 10 g de p-diméthylaminobenzaldéhyde.

### GLOSSAIRE

#### **Screening**

Tout test utilisé afin de détecter la présence d'un agent donné dans un large nombre de spécimens, de tels tests sont typiquement simples et peu coûteux mais ne sont pas complètement spécifiques. Un certain pourcentage de faux tests positifs peut être toléré comme screening positif mais doivent être relayés par d'autres tests plus spécifiques. Une autre définition interprète ce terme comme étant tout test qui permet d'assigner un organisme inconnu à un possible rang taxonomique.

#### **Souche**

Une souche bactérienne est constituée par une succession de cultures dérivées d'une culture pure (le plus souvent une colonie parfaitement isolée). Le nombre de cellules ayant permis la constitution de la culture pure (la formation d'une colonie isolée) est le plus souvent inconnu. Une souche n'est pas obligatoirement un clone (population de cellules dérivée d'une unique cellule).

#### **Niche écologique.**

Place et spécialisation d'une espèce à l'intérieur d'un peuplement. Elle correspond à l'ensemble des paramètres qui caractérisent les exigences écologiques (climatiques, alimentaires, reproductives, etc.) propres à une espèce vivante et qui la différencient des espèces voisines d'un même peuplement. Une confusion fréquente est faite entre niche écologique et habitat. Ce dernier correspond aux emplacements particuliers où l'espèce considérée se rencontre. La niche, elle, représente la fonction de l'espèce dans un écosystème.

#### **Isolat.**

Population séparée des autres populations de la même espèce par une barrière géographique et (ou) écologique et dont de ce fait les individus se reproduisent entre eux.

#### **Biotope.**

Composante d'un écosystème constituée par ses dimensions physico-chimiques et spatiales.



## Résumé

Cette étude ayant pour objectif de faire le criblage des souches thermophiles à partir d'eau, boue et de sédiment de la source thermale de Hammam Bouhanifia (MASCARA) et la mise en évidence de l'activité hydrolytique et antimicrobiennes des souches isolées.

85 isolats ont été purifiés et identifiés par des caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques, trois types d'activités hydrolytiques ont été recherchés par l'utilisation de cinq différents substrats, l'activité antimicrobienne des souches sélectionnées a été effectuée par la technique des stries croisées vis-à-vis les germes test *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *candida albicans*

Les isolats forment des bacilles à Gram positif, essentiellement, elles sont thermophiles modérées, aéro-anaérobies facultatifs et neutrophiles. Le screening des activités hydrolytiques a permis de trouver au moins trois types d'hydrolase chez tous les isolats, parmi les dix souches sélectionnées quatre d'entre elles ont une activité antimicrobienne contre les bactéries tests.

Enfin, notre étude nous a permis de caractériser et identifier nos isolats comme étant des Actinomycètes qui peuvent vivre dans une source thermale (milieu extrême) et montrer leurs importances dans le domaine de biotechnologie par leur capacité de production des substances bioactives comme les enzymes et les antibiotiques

**Mots clé :** Thermophiles, Screening, Actinomycète, Pouvoir enzymatique, Pouvoir antimicrobien.

## ملخص :

تهدف هذه الدراسة إلى فحص و عزل السلالات المحبة للحرارة و التي تم عزلها من الماء، الطين والرواسب من الينابيع الحارة (حمام بوحنيقية) و كذا تسليط الضوء على النشاط المائي و القدرة على مقاومة المكروبات الضارة للسلالات المعزولة.

تمت تنقية 85 عزلة وتحديدتها بواسطة الخصائص المورفولوجية والبيوكيميائية والفيزيولوجية، كما تم تحديد ثلاثة أنواع من النشاط المائي باستخدام خمس ركائز مختلفة، وتم تنفيذ النشاط المضاد للميكروبات في السلالات المحددة بواسطة تقنية النقاط. تشكل العزلات عصيات إيجابية للجرام، معتدلة الحرارة، هوائية و لاهوائية، كما أثبت فحص الأنشطة الإنزيمية قدرة هاته العزلات على إنتاج نوعين على الأقل من الهيدرولاز في جميع العزلات. من بين السلالات العشرة المختارة، أربعة كان لها نشاط مضاد للميكروبات ضد بكتيريا الاختبار.

أخيراً، سمحت لنا دراستنا بتمييز وتحديد عزلتنا على أنها أكتينوميستات يمكن أن تعيش في نبع حراري (البيئة القاسية)، إن لها أهمية بالغة في مجال التكنولوجيا الحيوية و ذلك من خلال قدرتها على إنتاج مواد نشطة بيولوجياً مثل الإنزيمات و المضادات الحيوية كلمات مفتاحية: محبة للحرارة، فحص، أكتينوميست، نشاط انزيمي، قدرة مضادة للميكروبات.

## Abstract

This study aims to screen thermophilic strains from water, mud and sediment from the thermal spring of Hammam Bouhanifia (MASCARA) and to highlight the hydrolytic and antimicrobial activity of isolated strains. 85 isolates were purified and identified by morphological, biochemical and physiological characteristics, three types of hydrolytic activity were sought by the use of five different substrates, the antimicrobial activity of the selected strains was carried out by cross-streaking technique against test germs *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *candida albicans*.

The isolates form Gram-positive bacilli, essentially they are moderate thermophilic, facultative aero-anaerobic and neutrophilic. Screening for hydrolytic activities found three or fewer types of hydrolase in all isolates, of the ten selected strains four had antimicrobial activity against the test bacteria.

Finally, our study allowed us to characterize and identify our isolates as being Actinomycetes that can live in a thermal spring (extreme environment) and show their importance in the field of biotechnology by their ability to produce bioactive substances such as enzymes and enzymes antibiotics.

Key-words: Thermophilic, Screening, actinomycete, Antimicrobial activity, Hydrolytic activity