



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم :.....: **Microbiologie** : Département

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologique

Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Micro-organismes

Intitulé :

La mise en évidence de la production de quatre enzymes (protéase, amylase, cellulase et pectinase) par des micro-organismes isolés à partir d'eau thermale et sol proche des sources thermales

Présenté et soutenu par:

Le: 27/06/2018

BOULEFKHAD Nesma et TALHI Ahlem

Devant le jury:

Président du jury: Melle. ARABET Dallel (M.C.B. UFM Constantine1).

Rapporteur: Mme. BENKAHOUL Malika (M.C.B. UFM Constantine1).

Examineurs: Mme. MILET Asma (Dr. UFM Constantine1).

Année Universitaire 2017 - 2018

Remerciements

En premier lieu et avant tout, nous remercions notre Grand Dieu le tout puissant qui nous a éclairé notre chemin, et nous a donné le courage, la force, la patience.

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de zoologie et du laboratoire de microbiologie au bloc de science, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri Constantine. Ainsi que à l'Etablissement Hospitalier Spécialisé Sidi-Mebrouk Constantine.

Nos sincères remerciements vont à Mme. Benkahoul pour l'honneur qu'elle nous a fait en dirigeant ce travail, pour ses aides, ses conseils, tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

Nos remerciements aux membres de jury :

Melle. Arabet de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Mme. Milet de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail

Mme. Leghlimi, Melle. Almi, Melle. Chorfiya, Melle. Abdelaziz,

Mme. Aïssaoui, Mme. Ketteb, Mr. Boudersa.

Nous ont été également d'une aide précieuse et nous les remercions vivement.

De manière globale, nous remercions toutes les personnes avec qui le contact fut enrichissant et sympathique.

Dédicace

*De tout mon cœur Je dédie ce modeste travail
A celle qui m'a ouvert les portails et m'a donné la tendresse et le
courage*

*A celle qui endeuillée pour me rendre heureuse
A celle qui attend chaleureusement ce jour: «ma chère Mère»*

*A celui qui a fait des grands efforts pour mon bonheur
A celui qui a rêvé de voir cette journée
A celui qui m'a orienté et m'a pris les secrets de la vie
« mon Père »*

A ma très chère sœur "Imen "

A mes frères "Khaled" , "Naim" , "Manar " et "Anis "

*A ma chère tante "Yasmina" et à toute ma grande famille qui m'ont
beaucoup soutenu moralement.*

*De ce côté de la terre, merci infiniment à mes
amies Nesma, Narimen, Rama et Oumssia pour leur
appui constant, leur amitié et leur
amour. Parce que finalement, le contenu
de ce travail est un reflet de l'amour ...*

Ahlem

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes très chers parents

*En témoignage de mon profond amour et mon plus grand respect.
Je ne vous remercierai jamais assez pour votre confiance, pour votre
soutien tout au long de ma scolarité et pour vos sacrifices.*

A mes frères et mes sœurs

*En témoignage de ma tendresse pour vous, je vous dédie ce travail
avec mes vœux de bonheur et de réussite.*

A tous mes amis surtout :

Ahlem, Ibtissem, Oumaima, Kaouther et hadjer

A tous mes professeurs

*Et à toutes les personnes qui m'ont aidée et soutenue de près
ou de loin*

Que Dieu vous protège et vous bénisse tous

Nesma

Sommaire

<i>Liste des tableaux</i>	
<i>Liste des figures</i>	
<i>Liste des abréviations</i>	
<i>Introduction</i>	1
<i>Revue bibliographique</i>	
<i>Chapitre I : Les milieux extrêmes</i>	
1. Notion des milieux extrêmes	4
1.1. Les eaux thermales	5
1.1.1. Définition	5
1.1.2. La microflore des eaux thermales	5
1.2. Le sol	6
1.2.1. Définition	6
1.2.2. La microflore du sol	6
<i>Chapitre II : Les micro-organismes</i>	
1. Généralité sur les champignons	9
1.1. Les moisissures	9
1.1.1. Classification	10
1.1.2. Mode de reproduction	11
1.1.3. Conditions de croissance	12
1.1.4. Conditions d'isolement	13
1.1.5. Intérêt industriel des moisissures	13
1.2. Les levures	15
1.2.1. Définition	15
1.2.2. Habitat	16
1.2.3. Classification	16

1.2.4. Mode de reproduction	17
1.2.5. Intérêt industriel des levures	18
2. Les bactéries	19
2.1. Définition	19
2.2. Classification	19
2.2.1. Selon le mode respiratoire	19
2.2.2. Selon la forme	19
2.2.3. Selon la structure de la paroi	20
2.2.4. Selon leur optimum de croissance	20
2.3. Les bactéries thermophiles	20
2.3.1. Classification des thermophiles	20
2.3.2. Niches écologiques des thermophiles	21
2.2.3. Application des thermophiles	22
<i>Chapitre III : Les enzymes</i>	
1. Généralités et origines des enzymes industrielles	25
1.1. Définition des enzymes	25
1.2. Classification des enzymes	25
1.3. Origine des enzymes industrielles	26
2. Les hydrolases	27
2.1. Les protéases	27
2.2. Les amylases	29
2.3. Les cellulases	30
2.4. Les pectinases	31
3. Les enzymes d'origine microbienne et leurs applications industrielles	32
<i>Matériel & Méthodes</i>	
1. Matériel biologique	35
1.1. Sol et eau	35
1.1.1. Présentation du site de prélèvement	35

1.1.2. Prélèvement des échantillons	36
1.2. Isolement des microorganismes	38
2. Mise en évidence des activités enzymatiques	41
2.1. La recherche de l'activité protéolytique (Hydrolyse des protéines)	41
2.1.2. Chez les bactéries	41
2.2. La recherche de l'activité amylolytique (Hydrolyse de l'amidon)	41
2.2.1. Chez les champignons	41
2.2.2. Chez les bactéries	42
2.3. La recherche de l'activité cellulolytique (Hydrolyse de la cellulose)	42
2.3.1. Chez les champignons	42
2.3.2. Chez les bactéries	42
2.4. La recherche de l'activité pectinolytique (Hydrolyse de la pectine)	43
2.4.1. Chez les champignons	43
2.4.2. Chez les bactéries	43
3. Identification des microorganismes sélectionnés	44
3.1. Identification des moisissures sélectionnées	44
3.1.1. Identification macroscopique	44
3.1.2. Identification microscopique	44
3.2. Identification de la levure sélectionnée	44
3.2.1. Etude des caractères macroscopiques	45
3.2.2. Etude des caractères microscopiques	45
3.3. Identification des bactéries sélectionnées	45
3.3.1. Identification macroscopique	45
3.3.2. Identification microscopique	45
3.3.3. Tests biochimiques	46
3.3.4. Test de thermo-résistance	47
3.3.5. Culture sur milieux sélectifs	48
<i>Résultats & Discussion</i>	

1. Isolement des microorganismes	50
2. Mise en évidence des activités enzymatiques	53
2.1. Champignons	53
2.1.1. Activité protéolytique	58
2.1.1. Activité amylolytique	58
2.1.2. Activité cellulolytique	58
2.1.3. Activité pectinolytique	59
2.2. Bactéries	60
2.2.1. Activité protéolytique	63
2.2.2. Activité amylolytique	64
2.2.3. Activité cellulolytique	64
2.2.4. Activité pectinolytiques	64
3. Identification des microorganismes sélectionnés	66
3.1. Identification des moisissures sélectionnées	66
3.1.1. Identification macroscopique	66
3.1.2. Identification microscopique	69
3.2. Identification de la levure sélectionnée	77
3.3. Identification des bactéries sélectionnées	78
3.3.1. Identification macroscopique	78
3.3.2. Identification microscopique	81
3.3.3. Tests biochimiques	84
3.3.4. Test de thermo-résistance	87
3.3.5. Culture sur milieux sélectifs	88
<i>Conclusion</i>	94
<i>Référence bibliographiques</i>	97
<i>Annexes</i>	
<i>Résumé</i>	

Liste
Des tableaux
Des figures
Des abréviations

Numéro	Titre	Page
Tableau 1	Nombre des microorganismes du sol sur une profondeur de 15cm.	6
Tableau 2	Exemples d'enzymes produites par les moisissures.	14
Tableau 3	Exemple de quelques enzymes d'intérêt industriel produites par les levures.	18
Tableau 4	Exemple de quelques enzymes produites par les bactéries.	23
Tableau 5	Classification des enzymes.	25
Tableau 6	Classification des protéases.	28
Tableau 7	Applications industrielles des enzymes d'origine microbienne.	33
Tableau 8	Tableau représentatif du site de prélèvement des échantillons (sol et eau).	37
Tableau 9	Nombre de souches fongiques et bactériennes isolées depuis les échantillons.	50
Tableau 10	Zones d'hydrolyses des souches fongiques testées après 5 jours incubation.	53
Tableau 11	Diamètre (mm) de zones d'hydrolyse de souches fongiques testées après 5 jours incubation.	56
Tableau 12	Zones d'hydrolyses des souches bactériennes testées après 24 h d'incubation.	60
Tableau 13	Activités hydrolytiques des souches bactériennes après 48h d'incubation.	63
Tableau 14	Observation macroscopique des moisissures sélectionnées sur milieu PDA.	66
Tableau 15	Etude microscopique des moisissures sélectionnées.	69
Tableau 16	Caractéristiques macroscopique et microscopique de la levure sélectionnée cultivées sur milieu PDA et incubées à 30°C pendant 48-72h.	77
Tableau 17	Critères macroscopiques des isolats bactériens isolés sur milieu GN.	78
Tableau 18	Critères microscopiques des isolats bactériens isolés sur milieu GN.	81
Tableau 19	Caractérisations biochimiques des différents isolats bactériens.	86
Tableau 20	Souches bactériennes sélectionnées sur différents milieux de culture.	88
Tableau 21	Souches bactériennes étudiées sur certains milieux sélectifs.	89

Numéro	Titre	Page
Figure 1	Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium (A): hyphe coenocytique ; (B): hyphe cloisonné.	9
Figure 2	Différents modes de sporulation et différents types de spores associées.	12
Figure 3	Localisation de Hammam Debegeh- Guelma (Source : Google earth).	35
Figure 4	Schéma d'isolement des microorganismes à partir de l'échantillon « Sol ».	39
Figure 5	Schéma d'isolement des microorganismes à partir de l'échantillon « Eau ».	40
Figure 6	Diamètre des zones de l'hydrolyse des souches fongiques testées après 5 jours incubation.	57
Figure 7	Pourcentage des genres de moisissures isolés, sélectionnés et identifiées.	76
Figure 8	Tests biochimiques pour les différents isolats.	85

EC : Enzyme Commission

EDTA : Ethylene Diamine Tetra Acetate

PGA : Polygalacturonique

PDA : Potatos Dextrose Agar

GN : Gélose Nutritive

CMC : Carboxyméthylcellulose

w/v : Wight by volum

TSI : Triple Sugar Iron

pH : Potentiel d'Hydrogène

S : Souche

M : Moisissure

L : Levure.

Φ : Diamètre

A : *Aspergillus*

B : *Baccillus*

AAF : Aero-anaeorobie-facultatif

VF : Viande-Foie.

NR : Nitrate Réductase

Introduction

Depuis très longtemps, les enzymes ont toujours fait partie de notre vie quotidienne (**Nobel e. Museum, 2004**). Elles sont présentes dans toutes les cellules et sont indispensables pour la survie de toutes les espèces vivantes. En effet, les enzymes sont capables de dégrader et de transformer différents composés se trouvant dans l'environnement du vivant. Un avantage pouvant être utilisé par certaines industries dans différents domaines. L'emploi des enzymes connaît un succès remarquable et ouvre des perspectives nouvelles. En effet certaines industries n'ont vu le jour que grâce à la mise sur le marché d'enzymes purifiés. En 1998, le marché mondial des enzymes a été estimé à environ 1.5 milliard de dollars et des augmentations allant de 2% à 25% de ce chiffre annuellement, dépendant du domaine ont été signalés (**Van Bielen et Li, 2002**).

La demande mondiale au niveau industriel pour les enzymes d'origine microbienne croit d'une année à l'autre et ce afin d'améliorer certains procédés de fabrications tels que l'industrie du textile (décoloration de jeans par exemple), la papeterie (procédé de blanchiment de la pâte à papier.), dépollution (attaque des substances phénoliques.), industrie alimentaire (boulangerie,...) (**Dvail et al., 2010**).

Pour faire face à la demande croissante des industriels notamment dans le domaine des biocatalyses et en se basant sur le modèle de la synthèse organique « traditionnelle » pour aboutir à une chimie « verte » plus respectueuse de l'environnement, de nombreux efforts ont été fournis pour la recherche d'enzymes d'intérêt industriel. Une attention particulière pour les enzymes provenant de microorganismes extrêmophiles a fait l'objet de plusieurs études.

En effet, les microorganismes extrêmophiles ont développés des stratégies très variées pour s'adapter aux contraintes physico-chimique aux quelles ils font face (température, pression, salinité et pH). Les enzymes qui participent à ces stratégies seront sans doute d'un grand intérêt pour intervenir dans les procédés industriels surement travaillant en conditions de haute température ou de grande salinité (**Gregoire et al., 2009**).

Le présent travail se résume en trois étapes :

- La première étape consiste à isoler des souches microbiennes locales à partir de deux milieux extrêmes (Eau thermale et sol proche des sources thermales).
- La deuxième étape est la mise en évidence de la production de quatre enzymes (Protéase, Amylase, Cellulase et Pectinase) par ces souches préalablement isolées.

- La troisième étape est l'identification des différentes souches productrices d'enzymes.

Chapitre I :
Les milieux extrêmes

Ce premier chapitre introduit les milieux extrêmes, en particulier l'eau thermale et le sol (sol proche de source thermale).

1. Notion des milieux extrêmes

Les environnements modérés (pH proche de neutre, température entre 20 et 40°C, pression d'air 1 atmosphère et des niveaux adéquats d'eau, de nutriments et de sels disponibles), sont importants pour maintenir la vie. Toute condition environnementale pouvant être perçue comme au-delà de la gamme acceptable normale est une condition extrême. De nombreux environnements extrêmes, tels que les sources acides ou chaudes, les lacs salins et/ ou alcalins, les déserts et fonds marins trouvés dans la nature contiennent des microorganismes connus comme étant extrêmophiles (**Satyanarayana et al., 2005**).

Un extrêmophile est un organisme dont les conditions de croissance optimales sont situées en dehors des environnements qualifiés de normaux (**Kristjansson et Hreggvidsson, 1995**). Un extrêmophile tolère non seulement une condition extrême spécifique, mais a besoin généralement de ces conditions pour la survie et la croissance. La plupart des extrêmophiles se trouvent dans le monde microbien (**Satyanarayana et al., 2005**). Parmi les microorganismes qualifiés d'extrêmophiles, on rencontre ceux qui se développent à des températures froides ou chaudes (psychrophiles et thermophiles), ceux qui vivent en présence de fortes concentrations de sel (halophiles), et/ou dans des milieux très acides ou basiques (acidophiles et alcalophiles) ou sous pressions élevées (piézophiles) (**Quérellou et Guézennec, 2010**).

Beaucoup d'organismes peuvent se développer dans des conditions extrêmes, mais pas nécessairement de façon optimale, ces organismes sont définis comme extrêmotrophes (**Horikoshi et Bull, 2011**). La gamme des extrêmes environnementaux tolérés par les microorganismes sont très larges que les autres. Les limites de la croissance et la reproduction des microorganismes sont : -12°C à plus de 100°C, pH 0 à 13, pressions hydrostatiques jusqu'à 1400 atmosphères et les concentrations en sel des saumures saturées (**Satyanarayana et al., 2005**). Ces conditions de vie non conventionnelles nous laissent penser que ces microorganismes de l'extrême ont mis en place des stratégies originales (enzymes spécifiques) pour s'adapter aux stress physico-chimiques auxquels ils sont confrontés dans leurs milieux (**Gregoire et al., 2009**).

1.1. Les eaux thermales

1.1.1. Définition

Une eau thermale ou eau thermo-minérale est une eau d'origine souterraine naturellement chaude à son émergence (à température supérieure à un seuil conventionnel). Cette propriété avec la composition chimique spécifique la rend utilisable pour divers fins, notamment thérapeutique (Scholler, 1962).

1.1.2. La micro flore des eaux thermales

La diversité géologique, hydrogéologique et physico-chimique (température modérément chaudes, pH neutre ou alcalin) des systèmes profonds, laisse supposer l'existence d'une biodiversité microbienne qui demeure mal connue (Gregoire *et al.*, 2009). En effet, les eaux thermales ne sont pas stériles, elles hébergent une flore microbienne dont la nature est liée aux caractéristiques physico-chimiques de ces biotopes. (<http://www.bdsp.ehesp.fr/Base/104525/>). En 1969, Tomas Brock a montré par des travaux que des microorganismes peuvent vivre à des températures avoisinant et même dépassant les 100°C. Les chercheurs ont ainsi constaté que ces microorganismes ont développé des structures moléculaires très particulières pour leurs protéines afin de résister aux pressions et aux températures élevées de leur environnement. Parmi les microorganismes existant dans les sources thermales, on retrouve :

- **Les bactéries**

Le genre le plus connu est celui de *Thermus* (vivant à proximité des sources d'eaux chaudes de 50 à 80°C), dont l'espèce *Thermus aquaticus* (bactérie gram-négative, aérobie et hétérotrophe) a été décrite par Thomas Brock en 1969, on trouve également les bactéries sulfatoréductrices (*Archaeoglobus*), les bactéries méthanogènes (*Methanococcus*), et les bactéries sulfo-oxydantes (*Beggiatoa*, *Pyrodictium*, *Thermococcus*, *Pyrococcus*, *Thiothrix*) (Zoran Minic *et al.*, 2006).

- **Les Archaeobactéries**

Les Archaeobactéries sont présentes dans les environnements extrêmes, tels que les sources chaudes (Woese and Fox, 1977). Au niveau des sources hydrothermales, on trouve l'Archaea *Pyrococcusabyssi*, qui peut se développer jusqu'à 106°C. *Pyrolobusfumarum* peut croître à 113°C (Zoran Minic *et al.*, 2006).

1.2. Le sol (Sol proche de sources thermales)

1.2.1. Définition

Le sol est un milieu poreux constitué d'un ensemble de cinq fractions différentes : les minéraux solides, la matière organique, la fraction vivante, la phase gazeuse, et la phase liquide (Morel, 1989). En effet, les cinq principaux facteurs impliqués dans la constitution du sol : la roche mère, le climat, la topographie, l'activité biologique et le temps (Atlas et Bartha, 1992).

Selon le pédologue français Duchaufour (1965) : « Le sol est un complexe dynamique, caractérisé par une atmosphère interne, une économie de l'eau particulière, une flore et une faune déterminée, des éléments minéraux. Mais le sol est aussi un milieu dynamique car ses propriétés s'acquièrent progressivement sous l'action combinée des facteurs du milieu ».

1.2.2. La microflore du sol

La microflore du sol est principalement dominée par les bactéries, les champignons, les algues et les protozoaires. Les bactéries et les champignons sont les organismes dominants (Tableau 1) (Hoorman et Islam, 2010).

Tableau 1 : Nombre des microorganismes du sol sur une profondeur de 15cm (Hoorman et Islam, 2010).

Microorganismes	Nombre (g/sol)	Biomasse (g/m ²)
Bactéries	10 ⁸ -10 ⁹	40-500
Champignons	10 ⁵ -10 ⁶	100-1500
Algues	10 ⁴ -10 ⁵	1-50
Protozoaires	10 ³ -10 ⁴	Variée

- **Les bactéries**

Les bactéries sont parmi les microorganismes les plus abondants et métaboliquement les plus actifs du sol. En fonction des propriétés du sol, tous les types physiologiques bactériens sont représentés : autotrophes et hétérotrophes, mésophiles, thermophiles et psychrophiles, aérobies et anaérobies. Les bactéries du sol sont à dominante Gram positif, avec comme groupes principaux : les Corynébactéries, les Actinomycètes, les Mycobactéries et les Nocardiformes. Les genres les plus communément isolés sont. *Arthrobacter*, *Pseudomonas*,

Achromobacter et *Bacillus*, dans les couches aérobies alors que les bactéries du genre *Clostridium* sont dominantes dans les conditions anaérobies (**Bousseboua, 2005**).

- **Les champignons**

Les champignons du sol constituent une biomasse aussi importante que celle des bactéries. Leurs activités métaboliques sont multiples et fondamentales à l'équilibre écologiques des sols, par : leurs interactions avec les systèmes racinaires des plantes, leur aptitude de colonisation et de dégradation des débris organiques de grande taille et des composés de structures complexes. De nombreux travaux indiquent la prédominance de : *Mucor*, *Trichoderma* et *Aspergillus*, alors que *Rhizopus*, *Fusarium*, *Zygorhynchus*, *Cephalosporium*, *Cladosporium* et *Verticillium* sont couramment isolés (**Bousseboua, 2005**).

- **Les algues**

Les algues sont photoautotrophes et sont surtout présentes sur la surface du sol ou en subsurface pour recevoir un minimum d'éclairage nécessaire pour la photosynthèse. Certaines sont hétérotrophes (Euglènes) peuvent vivre plus profondément (**Maier et al., 2000**).

Quatre groupes majeurs sont retrouvés dans le sol, il s'agit des algues vertes, vert-jaune ou rouges et des cyanobactéries (**Wild, 1993**).

- **Les protozoaires**

Les protozoaires isolés des sols sont variés et se développent dans les zones superficielles humides, au niveau des films d'eau entourant les particules (**Bousseboua, 2005**). La majorité sont des hétérotrophes, certains sont phototrophes. Ils se nourrissent de bactéries, de levures, de champignons et d'algues, ils peuvent être impliqués dans la décomposition de la matière organique (**Maier et al., 2000 ; Wild, 1993**).

Chapitre II :
Les micro-organismes

Ce deuxième chapitre est consacré à l'étude des micro-organismes, notamment les champignons et les bactéries.

1. Généralité sur les champignons

Les champignons représentent l'un des plus importants groupes d'organismes et jouent un rôle clé dans un grand nombre d'écosystèmes (Mueller et Schmit, 2007). Ce sont des micro-organismes eucaryotes. Ils sont classés en trois groupes par rapport à leurs importances industrielles : les champignons filamenteux (moisissures), les levures et les champignons supérieurs (Brock *et al.*, 1994).

1.1. Les moisissures

Les champignons filamenteux, appelés aussi moisissures sont définies comme des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles. Leur structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique et sont caractérisées par une structure mycélienne (Nicklin *et al.*, 2000). Leur appareil végétatif (thalle) est constitué par des filaments ramifiés «les hyphes» (Gonçalves *et al.*, 2005). Leur organisation est coenocytique à l'intérieur de la structure filamenteuse, entourée d'une paroi rigide. Les hyphes de ces champignons sont dotés de cloisons transversales à intervalles réguliers. Ces derniers sont percés d'un pore central permettant la libre circulation du cytoplasme et des noyaux (Figure 1) (Justa-Schuch *et al.*, 2010). Néanmoins, on dit qu'ils ont un mycélium «cloisonné». Le mycélium peut se différencier des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination, auxquels on accorde la dénomination globale de spores (Bourgeois, 1989).

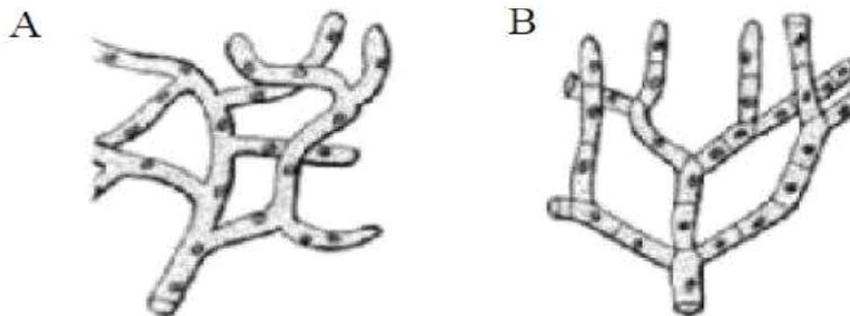


Figure 1: Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium
(A):hyphe coenocytique ; (B): hyphe cloisonné (Chabasse *et al.*, 2002).

1.1.1. Classification

Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques. Leur classification est basée aussi bien sur des caractères morphologiques (structure du mycélium) que sur le mode de leur reproduction (**Davet, 1996**).

- **Les Eumycètes**

Les Eumycètes ou les vrais champignons forment un groupe très vaste incluant les classes principales des moisissures (**Bourgeois, 1989**) à savoir les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes.

- **Zygomycètes**

Ces moisissures possèdent un mycélium non cloisonné et des organes de reproduction sexuée (**Guiraud, 1998**). La famille la plus importante dans cette classe est celle de Mucorales qui comprend un grand nombre de moisissures saprophytes mais aussi quelques espèces parasites des champignons, des animaux et des hommes (mucormycoses) et surtout des contaminants de nombreux produits alimentaires (**Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996**).

Certaines Mucorales sont parfois utilisées industriellement en raison de leurs activités enzymatiques (amylase, protéase,...) comme *Rhizopus* et *Mucor* (**Guiraud, 1998**).

- **Ascomycètes**

Les Ascomycètes sont définis comme des champignons à thalle mycélien cloisonné, dont le mode de reproduction est sexué avec des spores endogènes (ascospores). Cette classe regroupe de nombreux parasites des végétaux mais aussi de nombreuses moisissures (**Guiraud, 1998**). Elles sont cependant plus particulièrement nombreuses dans l'ordre des Eurotiales, des Microsciales et des Sphaeriales. Dans cette classe, le genre le plus connu est *Endothia* et *Neurospora* (**Bourgeois, 1998**).

- **Basidiomycètes**

Elles regroupent seulement certaines moisissures parasites. Elles sont caractérisées par un thalle à mycélium septé et une reproduction sexuée avec la formation de spores exogènes (basidiospores), c'est le cas de *Agaricus* et *Coprinus* (**Botton et al., 1999**).

- **Deutéromycètes**

Les deutéromycètes, également appelés champignons imparfaits sont caractérisés par un mycélium cloisonné et une reproduction végétative réalisée par des spores asexuées ou par simple fragmentation du mycélium (**Boiron, 1996**). Ces moisissures constituent la majeure partie des Hyphales. Elles sont classées en fonction des caractéristiques des organes conidiens et du mode de groupement des hyphes.

Le groupe des Deutéromycètes contient un grand nombre de contaminants de végétaux et de produits alimentaires : *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum* et regroupe aussi les *Penicillium* et les *Aspergillus* (**Frazier, 1967 ; Punt et al., 2002**).

1.1.2. Mode de reproduction

Les moisissures produisent des organes de reproduction que l'on appelle de façon générale spores et qui peuvent avoir une origine sexuelle ou végétative. Les spores d'origine sexuelle résultent d'une fécondation (zygospores et oospores) ou d'une méiose (ascospores ou basidiospores) alors que les spores d'origine végétative résultent d'une simple mitose que l'on appelle fréquemment conidies. Elles assurent la reproduction et la dissémination chez les espèces de formes imparfaites mais on les trouve également chez les autres groupes où elles coexistent des formes de reproduction sexuée et leur type varie selon les moisissures.

- **Les thallospores** : sont formées aux dépens du thalle par transformation d'éléments préexistants.
- **Les sporangiospores** : sont des cellules flagellées ou non ne provenant pas d'une fraction préexistante du thalle.
- **Les conidiospores** : sont des cellules qui ne sont pas issues directement d'une portion préexistante du thalle. Ces spores toujours terminales naissent d'un filament appelé conidiophore (metulae, phialide, etc.) (**Figure 2**) (**Guiraud, 1998**).

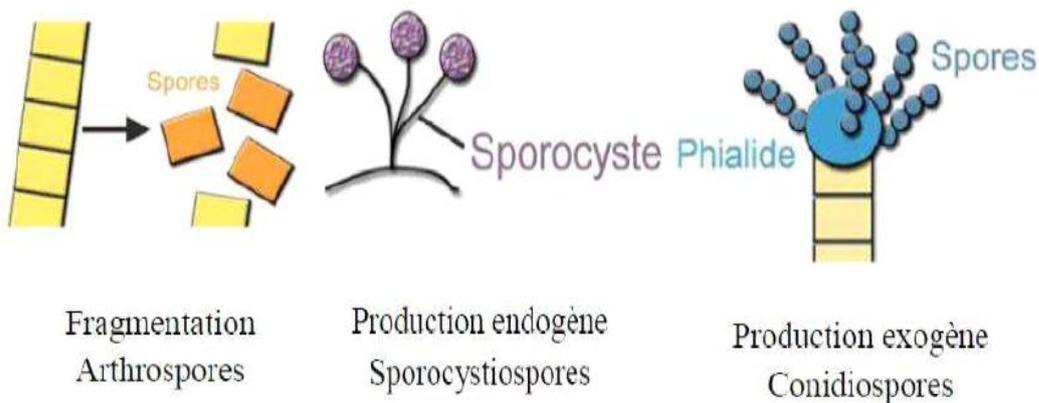


Figure 2 : Différents modes de sporulation et différents types de spores associées
(Barnett et Hunter 1998).

1.1.3. Conditions de croissance

- **Éléments nutritifs**

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes, elles exigent donc la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu qui assure leur croissance. Elles possèdent une panoplie enzymatique extrêmement riche qui leur permet d'utiliser plus efficacement encore que les bactéries les substrats les plus complexes. Leur digestion doit commencer dans le milieu extérieur par des enzymes excrétées (extracellulaires) ou liées à la paroi car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme (Davet, 1996).

- **Source de carbone et d'énergie**

Pratiquement, tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart de ces dernières peuvent métaboliser le glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Boiron, 1996 ; Nicklin *et al.*, 2000). Certaines moisissures produisent des lipases extracellulaires capables d'hydrolyser les lipides en glycérol et en acides gras qui peuvent être assimilés par beaucoup d'espèces fongiques, alors que seulement certaines espèces utilisent les acides organiques et l'éthanol (Boiron, 1996).

- **Source d'azote**

La plupart des moisissures assimilent l'ammoniac sous forme de sels (NH_4^+) dont la présence réprime l'utilisation d'autres sources azotées (nitrate, acides aminés, protéines). L'ammoniac est transformé en acide glutamique, en glutamine ou en d'autres acides aminés par transamination (**Boiron, 1996**), alors que seules certaines espèces utilisent le nitrate. D'autres ne peuvent croître qu'en présence d'azote organique et aucune moisissure ne peut fixer l'azote atmosphérique (**Punt et al., 2000**).

- **Éléments minéraux**

La présence des ions minéraux et métaux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction de plusieurs espèces fongiques, il s'agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus ou moins différentes selon l'espèce (**Uchicoba et al., 2001**). Des traces d'éléments tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, sont nécessaires à la plupart des moisissures pour la production des cytochromes, des pigments, des acides organiques, etc. (**Boiron, 1996**).

1.1.4. Conditions d'isolement

Pour permettre l'expression la plus complète possible des microorganismes recherchés, il convient de retenir au laboratoire les facteurs et les paramètres de l'environnement naturels qui ont pu favoriser l'implantation d'une flore particulière. La plupart des moisissures requièrent pour leur développement de l'oxygène et croissent bien en l'absence de lumière. Leur tolérance à l'égard du pH est souvent étendue mais avec généralement une préférence pour les pH légèrement acides. Concernant la température, leur gamme compatible avec la croissance est très large et diffère selon les espèces (**Botton et al., 1999 ; Julien, 2002 ; Coulibaly et Agathos, 2003**).

1.1.5. Intérêt industriel des moisissures

Les moisissures jouent un rôle primordial dans divers domaines d'applications ; elles sont utilisées dans les industries alimentaires, chimiques, la biolixiviation et la biotransformation, etc. Cependant l'industrie n'exploite commercialement qu'un petit nombre de métabolites de quelques espèces seulement (**Boiron, 1996**). Leur intérêt économique repose sur leur activité biologique dans la production d'une grande diversité de molécules produites au cours des

métabolismes primaires et secondaires, exploitées en particulier par l'industrie pharmaceutique et en médecine (Larpend-Gourgaud et Sanglier, 1992).

- **Production des enzymes par les moisissures**

Le **tableau 2** ci-dessous regroupe quelques enzymes industrielles produites par quelques moisissures.

Tableau 2: Exemples d'enzymes produites par les moisissures.

Enzymes	Espèces	Références
Protéase	<i>Aspergillus oryzae</i>	(Garcia-Gomez et al., 2009).
	<i>Aspergillus terreus</i>	(Wu et al., 2006).
	<i>Aspergillus clavatus</i> ESI	(Hajji et al., 2007).
	<i>Mucor circinelloides</i>	(Sathya et al., 2009).
	<i>Conidiobolus coronatus</i>	(Laxman et al., 2005).
	<i>Penicillium</i> sp.	(Germano et al., 2003).
	<i>Bauveria felina</i>	(Agrawal et al., 2005).
Amylase (α-amylase)	<i>Aspergillus oryzae</i>	(Agger et al., 1998).
	<i>Aspergillus niger</i>	(Botton et al., 1990 ; Akbache et Bariout, 2007).
	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus sojae</i>	(Aidoo et al., 1981 ; Khoo, 1994).
	<i>Rhizopus oryzae</i>	(Lucio et al., 1996 ; Cuveillier, 1999 ; Akbache et Bariout, 2007).
	<i>Penicillium griseoroseum</i>	(Ray, 2001).
	<i>Penicillium fellutanum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	(Kathiresan et Mannivanan, 2006 ; Ertan et Balkan, 2007).
	<i>Alternaria alternata</i>	(Lateef et al., 2004).
Cellulase	<i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Sphaeromonas communis</i> , <i>Piromonas communitis</i> , <i>Chytridomycètes</i> <i>Trichoderma viridae</i> ,	(Béguin et Aubert, 1992).

	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Trichoderma koningi</i> , <i>Aspergillus aculeatus</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Sporotrichum pulverulentum</i> , <i>Chaetomium cellulolyticum</i> , <i>Humicola insolens</i>	(Béguin et Aubert, 1992).
Pectinase	<i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Rhizopus</i> <i>Mucor</i> <i>Penicillium</i> <i>Penicillium</i> <i>Trichoderma</i>	(Priya. and Sashi., 2014).

1.2. Les levures

Les levures sont les premiers micro-organismes utilisés par l'homme depuis des millénaires, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et du pain par fermentation (Pol, 1996). Elles sont également les premiers micro-organismes à être observés au microscope par Van Leeuwenhoek en 1680 qui les a dessinées. Ce n'est qu'avec les travaux de Pasteur (1866-1876) que le rôle des levures dans la fermentation alcoolique a été mis en évidence. A la même époque, la levure fut à l'origine du développement de la biochimie avec notamment les travaux de Büchner.

Les levures constituent un matériel expérimental de choix en raison de leur double état de micro-organismes et d'eucaryotes (Pol, 1996).

1.2.1. Définition

Le mot levure, selon Phaff *et al.* (1968), provient du mot latin « levare » qui se traduit par « soulever », type de cellules de champignons. Au sens propre, les levures sont des cellules capables de produire du dioxyde de carbone faisant « lever » les pâtes par fermentation oxydative des glucides (Oteng-Gyang, 1984). Elles ont la particularité d'émettre des bourgeons polaires ou latéraux, générateurs d'autres cellules, identiques à la cellule mère (Euzéby, 2008). Les levures sont des eucaryotes unicellulaires, ayant la capacité de se

multiplier rapidement car elles sont moins exigeantes en nutriments (**Lammi, 2011**). Elles sont facilement mises en œuvre dans d'autres exploitations (culture, recherche et applications industrielles) par rapport aux procaryotes (**Pol, 1996 ; Benaouida, 2008**).

1.2.2. Habitat

Les levures sont des espèces ubiquitaires, largement distribuées dans la nature. Elles se rencontrent sur les végétaux riches en sucre directement assimilables (**Bouix et Leveau, 1991**). En effet, les milieux fortement concentrés en sucre représentent un de leur environnements préférés, comme les sirops, le miel, les fleurs et de nombreux fruits (les pommes, les raisins) (**Leclerc, 1975 ; Oteng-Gyang, 1984**). On trouve également des levures à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants, dans les eaux, dans l'atmosphère et dans le sol. Par ailleurs, le sol constitue un large réservoir assurant leur survie dans des conditions défavorables (**Merabti, 2006**).

1.2.3. Classification

Les levures sont classées selon leur forme, leur possibilité de former un voile, de fermenter les sucres et de les assimiler (glucose, galactose, saccharose, maltose, lactose, raffinose). Toute souche incapable de fermenter le glucose est également incapable de fermenter un autre sucre. Tandis que, toute souche capable de fermenter le glucose, peut également fermenter le fructose, le mannose et le raffinose. L'assimilation des nitrates, l'utilisation de l'éthanol, la production de pigments sont aussi des critères de classification. En particulier, de nouveaux critères taxonomiques sont pris en considération pour permettre des études plus précises. La classification utilisée est celle établie par **Kreger-Van (1984)** qui présente des changements sensibles. Il s'agit d'un groupe hétérogène, qui d'un point de vue taxonomique, comprend une soixantaine de genres et près de 500 espèces (**Benaouida, 2008**). Les levures se divisent en 3 grandes classes :

- **Levures Ascomycètes (Hémiascomycètes)**

Elles forment notamment la famille de Saccaromycetaceae divisée en 4 sous-familles:

- Les Schizosaccharomycetoideae sont des levures à mycélium et anthrospores.
- Les Saccharomycetoideae possèdent des cellules bourgeonnantes et ont des spores non fusiformes.
- La sous famille des Nadsonioideae à bourgeonnement biopolaire.
- Les lipomycetoideae à bourgeonnement et asque en sac (**Alphonse et al. 2004**).

- **Levures Basidiomycètes**

Elles présentent une reproduction sexuée à basidiospores. Cette classe comporte peu de levures d'intérêt industriel (**Alphonse et al., 2004**).

- **Levures Deutéromycètes (sans sexualité)**

Regroupent l'ensemble des levures se multipliant que par reproduction végétative et qui ne présentent pas un mode connu de reproduction sexuée (**Bouix et Leveau, 1991**).

Selon **Alphonse (2004)**, elles constituent la famille des *Cryptococcaceae* qui est divisée en 4 sous-familles :

- Les *Cryptococcoideae* sont des levures à cellules bourgeonnantes, elles ne forment pas d'arthrospores et n'ont pas de pigments.
- Les *Rhodotoruloideae* (*Rhodotorula*) sont pigmentés.
- Les *Trichospororoideae* (*Rhodotorula*) forment des arthrospores.
- Les *Sporobolomycetoideae* qui contiennent peu d'espèces.

Quelques-unes appartenant au genre *Sporobolomyces* sont considérés parfois comme contaminants des denrées alimentaires.

Ces eucaryotes, par leur capacité de produire des métabolites fonctionnels, sont mis à contribution dans l'élaboration de bio-médicaments et constituent un vaste réservoir de catalyseurs biologiques (**Saci, 2012**).

1.2.4. Mode de reproduction

La plupart des levures se reproduisent aussi bien par un cycle asexué (végétatif) que par un cycle sexué (sporulation) en fonction des conditions favorables ou défavorables du milieu (**Larpent-Gourgaud, 1997**). La reproduction asexuée s'effectue par bourgeonnement ou par fission (scissiparité) à partir d'une cellule mère. Alors que, la reproduction sexuée s'effectue par conjugaison des deux cellules qui donnent naissance à un Zygote. Après différenciation et méiose un asque à 4 ascospores haploïdes se forme (**Oteng-Gyang, 1984**).

1.2.5. Intérêt industriel des levures

Les levures présentent des éléments favorables par rapport aux bactéries quant à leur utilisation en biotechnologie. Elles offrent donc une meilleure résistance aux conditions de stress, en particulier la possibilité à des pH acides. Leur utilisation dans l'alimentation a fait de sorte que les levures soient globalement plus connues par leur efficacité en fermentation industrielle que d'autres micro-organismes.

Les levures ont de grandes activités métaboliques et sont donc très utilisées dans le domaine agricole et alimentaire. Elles ne sont pas attaquées par des virus (phages), elles sont facilement récupérables grâce à leur grosseur (**Lagzouli et al., 2007**). Leur stabilité génétique permet aussi une très bonne fidélité du procédé et la connaissance de leur physiologie cellulaire facilite leur utilisation (**Labrecque, 2003**).

Enfin, les bonnes connaissances de la biologie moléculaire des levures et la mise au point de techniques de génie génétique, permettant de programmer les levures de façon qu'elles expriment des protéines humaines et animales recombinantes ; constituent une grande réussite des biotechnologies surtout d'intérêt médical (par la production d'enzymes, d'hormones peptidiques, de facteurs de croissance, d'hémoglobines, de ferritines, l'érythropoïétine, etc.) (**Lammi, 2011**).

- **Production des enzymes par les levures**

Voici certaines enzymes industrielles produites par les levures regroupées dans le **tableau 3** ci-dessous.

Tableau 3 : Exemple de quelques enzymes d'intérêt industriel produites par les levures.

Enzymes	Espèces	Références
Protéase	<i>Aureobasidium pullulans</i>	(Chi et al., 2007).
	<i>Candida lipolytica</i>	(Tobe et al., 1976).
Amylase (α -amylase)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Liese et al., 2000 ; Ruohonen et al., 1991).
	<i>Candida guilliermondii</i>	(Akbache et Bariout, 2007).
	<i>Candida tropicalis</i>	(Liese et al., 2000).
	<i>Candida</i> sp. <i>Pichia</i> sp.	(Ruohonen et al., 1991).
Cellulase	<i>Candida molischiana</i> , <i>Candida pulcherrima</i> ,	(Béguin et Aubert, 1992).

	<i>Candida stellata</i> , <i>Candida wickerhamii</i> , <i>Cryptococcus flavus</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Rhodotorula glauca</i> , <i>Saccharomyces fibuligeratinis</i> , <i>Trichosporon cutanum</i>	
Pectinase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Djouldé Darman <i>et al.</i> , 2005).

2. Les bactéries

2.1. Définition

Les bactéries sont des micro-organismes vivants procaryotes unicellulaires qui mesurent 0.5 à 15 µm de long. Elles ont été découvertes à la fin du 17^{ème} siècle par Anthoni Van Leeuwenhoek, naturaliste hollandais, qui inventa la microscopie. Elles sont ubiquitaires et sont présentes dans tous les types de biotopes ; sol, eau, air, sur les végétaux et les animaux. (Perry *et al.*, 2004).

2.2. Classification

Selon Gaillard (1998), les bactéries sont classées selon plusieurs critères.

2.2.1. Selon le mode respiratoire

- **Aérobic stricte** : Ce sont les bactéries qui ne se développent qu'en présence d'air, leur source principale d'énergie est la respiration.
- **Microaérophiles** : Elles se développent dans un milieu où la pression partielle de l'O₂ est inférieure à celle de l'air.
- **Aéro-anaérobic facultatifs** : Elles se développent avec ou sans air.
- **Anaérobic stricte**: Elles se développent en absence de l'air (Bernard ; 2004).

2.2.2. Selon la forme

- Bâtonnet.
- Sphérique (cocci).
- Courbée (spiralée).

2.2.3. Selon la structure de la paroi

- **Gram+** : possède une paroi épaisse, d'une structure simple et relativement sensible aux antibiotiques. Elle donne une coloration violette.
- **Gram -** : possède une paroi moins rigide et d'une structure plus complexe, toujours pourvues de pilis. Elle donne une coloration rose de paroi (**Perry et al., 2004**).

2.2.4. Selon leur optimum de croissance

Les bactéries peuvent être classées en quatre groupes :

- Les psychrophiles (-5 à 20°C).
- Les mésophiles (15 à 45°C).
- Les thermophiles (45 à 80°C).
- Les hyperthermophiles (≥ 80 °C) (**Vieille et Zeikus, 2001**).

2.3. Les bactéries thermophiles

Il s'agit de microorganismes ayant une capacité de vivre et s'épanouir en conditions exceptionnellement dures de températures (**Fandi et al., 2012**). Leur température optimale de croissance est comprise entre 50 et 80°C (**Holden, 2009**).

2.3.1. Classification des thermophiles

La température est une variable importante de chaque écosystème. Pour cette raison, la classification des organismes vivants sur la base de leur température optimale de croissance est considérée comme un aspect fondamental de la taxonomie microbiologique (**Wiegel et Canganella, 2001**).

Les thermophiles sont des organismes vivants à des températures optimales de croissance comprises entre 50°C et 80°C, les hyperthermophiles ont des optima au-dessus de 80°C. La limite inférieure de thermophilie est retrouvée dans peu d'environnements dans la nature et est considérée comme étant la température au-dessus de laquelle il est très rare de retrouver des eucaryotes. La frontière hyperthermophile est arbitraire mais sépare les organismes qui se développent aux températures élevées. Les hyperthermophiles sont également caractérisés par la présence de la gyrase reverse, une enzyme responsable de la stabilisation de l'ADN bicaténaire aux températures élevées (**Holden, 2009**).

2.3.2. Niches écologiques des thermophiles

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

- **Biotopes naturels**

Les environnements naturellement chauffés sont distribués entre les sites volcaniques terrestres (y compris les solfatares), les sources hydrothermales terrestres, les systèmes hydrothermiques sous-marins (sédiments, volcans submersibles, fumerolles, et passages), les sites souterrains, tels que les réserves de pétrole, et les sols chauffés par le soleil (**Oshima et Moriya, 2008**).

- **Biotopes marins**

Les biotopes marins des thermophiles sont les systèmes hydrothermaux localisés dans les zones côtières, les profondeurs abyssales, et au niveau des montagnes sous-marines actives comme Teahicya et Macdonald en Polynésie (**Huber et al., 2000**). Ces écosystèmes sont caractérisés par de fortes concentrations en sel (environ 3%, w/v), et par des valeurs de pH variant de faiblement acides à faiblement alcalines (pH 5,0-8,5). Dans les zones volcaniques actives, de grandes quantités de vapeur contenant du dioxyde de carbone, du sulfure d'hydrogène et des quantités variables d'hydrogène, de méthane, d'azote, de monoxyde de carbone et des traces d'ammonium et de nitrate sont produites (**Huber et al., 2000**). De plus, les composés soufrés majeurs présents dans les zones marines chaudes sont le soufre, le thiosulfate et le sulfate.

- **Biotopes terrestres**

Dans les systèmes terrestres, lorsque l'eau surchauffée approche de la surface, la pression baisse et l'eau est projetée comme des jets ou bulles d'eau chaude connus sous le nom de geysers. Les systèmes thermiques terrestres sont retrouvés dans beaucoup d'endroits autour du monde. Leur composition en minéraux, en nutriments et leur concentration en gaz diffèrent considérablement. Le pH varie de 1 à 10. Par conséquent, les communautés microbiennes habitants ces régions thermiques sont également très variées par leurs conditions physiques et géochimiques (**Ferrera et Reysenbach, 2007**).

Il existe sur le territoire algérien plus de 240 sources thermales, réparties géographiquement entre le Nord (plus particulièrement dans les régions de l'Oranie, de la Kabylie et du Constantinois) et le Sud du pays (la région orientale du Sahara septentrional algérien) (Ouali *et al.*, 2007 ; Saibi, 2009). Les températures mesurées à l'émergence varient de 22°C à 98°C (Kedaïd, 2007 ; Saibi, 2009). Les températures les plus élevées sont enregistrées à Hammam Bouhnifia (68°C) pour la région Ouest, à Hammam El Biban (80°C) dans la région Centre, et à Hammam Meskhoutine (98°C) pour la région Est. Dans la région Sud, certaines sources chaudes dépassent parfois les 50°C (Saibi, 2009).

- **Biotopes artificiels**

Les thermophiles habitent également les systèmes thermiques artificiels tels que les circuits d'alimentation et les réservoirs d'eau chaude, les centrales nucléaires, les usines géothermiques, les puits et forages de pétrole, le compost et les bioréacteurs (Ferrera et Reysenbach, 2007).

2.3.3. Application des thermophiles

Les procédés biotechnologiques et industriels nécessitent une thermostabilité des enzymes utilisés. Un grand nombre d'enzymes de bactéries thermophiles ont été caractérisés, comme les cellulases, les amylases, les pullulanases, les xylanases, mannanase, pectinases, chitinases, protéases, lipases, les estérases et les phytases (Sunna et Bergquist, 2003).

L'utilisation des enzymes thermostables comprend la possibilité de réduire le risque de contamination (Raddadi *et al.*, 2015). Ces enzymes possèdent la propriété physique et les interactions électrostatiques pour garder l'activité à de grandes températures. Ils possèdent différentes adaptations, telles que la capacité de garder leur configuration et leur fonction dans les extrêmes de température en présence des solvants organiques (jusqu'à 99%), résistance aux agents protéolytiques et aux valeurs extrêmes de pH (Egorova et Antranikian, 2005 ; Mayer *et al.*, 2012).

- **Production des enzymes par les bactéries**

Le **tableau 4** résume quelques enzymes industrielles produites par les bactéries.

Tableau 4 : Exemple de quelques enzymes produites par les bactéries.

Enzymes	Espèces	Références
Protéase	<i>Bacillus licheniformis</i>	(Ferrero <i>et al.</i> , 1996).
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(George <i>et al.</i> , 1995).
	<i>Bacillus subtilis</i>	(Soares <i>et al.</i> , 2005).
	<i>Bacillus</i> sp.	(Patel <i>et al.</i> , 2005).
	<i>Virgibacillus</i> sp. SK33	(Sinsuwan <i>et al.</i> , 2008).
	<i>Synergistess</i> sp.	(Kumar <i>et al.</i> , 2008a).
Amylase (α -amylase)	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i>	(Tamura, 1993).
	<i>Lanuginosusthermomyces</i> <i>Lactobacillus casei</i>	(Liese <i>et al.</i> , 2000).
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(Liese <i>et al.</i> , 2000 ; Uiger et çurakoglu ,2001).
	<i>Bacillus steorothermophilus</i>	(Dauter <i>et al.</i> , 1999).
	<i>Bacillscirculans</i>	(Dey <i>et al.</i> ,2002).
	<i>Bacillscoagulans</i>	(Babu et Satyanaray, 1993).
	<i>Alteromonashaloplanktis</i>	(Feller <i>et al.</i> , 1992).
	<i>Termusfiliformis</i>	(Egas <i>et al.</i> , 1998).
	<i>Streptomycesrimosus</i>	(Vukelić <i>et al.</i> , 1992).
	Cellulase	Aérobies : <i>Sporocytophaga</i> , <i>Myxococcoides</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Cellulomonas</i> et <i>Pseudomonas</i> . Anaérobies strictes : <i>Clostridium thermocellum</i> , <i>C. stercorarium</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>R. flavefasciens</i> , Bactéroi des <i>succinogenes</i> . Anaérobies facultatives : <i>Erwiniachrysantharum</i> . Anaérobies strictes : <i>Clostridium thermocellum</i> , <i>C. stercorarium</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>R. flavefasciens</i> et Bactéroi des <i>succinogenes</i>
Pectinase	<i>Bacillus</i> sp	(Djouldé Darman <i>et al.</i> , 2005).
	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	

Chapitre III :
Les enzymes

Ce dernier chapitre est consacré pour les enzymes, notamment les hydrolases (les protéases, les amylases, les cellulase et les pectinases).

1. Généralités et origines des enzymes industrielles

1.1. Définition des enzymes

Les enzymes sont des macromolécules protéiques de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa). Elles catalysent les réactions chimiques en augmentant leurs vitesses d'au moins 10⁶ fois, par rapport à la réaction en leur absence (**Granner, 2008**). En effet, les enzymes sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (**Bergmeyer et al., 1979 ; Amaud et al., 1993 ; Pelmont, 1995 ; Drouin, 2005**).

En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées (**Patel et al., 2005**), la structure d'environ 1300 d'entre elles a été déterminée (**Leisola et al., 2001**).

1.2. Classification des enzymes

La commission des enzymes de l'union internationale de biochimie classe les enzymes en six grandes classes, selon leur activité catalytique (**Tableau 5**) (**Vincent, 1996**).

Environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases (**Rao et al., 1998 ; Assamoi et al., 2009**).

Tableau 5 : Classification des enzymes (**Vincent, 1996**).

E.C (classe)	Classification	Type de réaction catalysée
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction
E.C.2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse(coupe les liens chimiques par addition d'une molécule d'eau)
E.C.4	Lyases	Elimination de groupement et formation de doubles liaisons
E.C.5	Isomérases	Isomérisation
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

E.C. (Enzyme Commission)

1.3. Origine des enzymes industrielles

Les enzymes industrielles peuvent avoir plusieurs origines dont les végétaux, les animaux et les microorganismes (**Amaud et al., 1993 ; Scriban, 1993 ; Rao et al., 1998 ; Meunier, 1999**).

Les microorganismes constituent la principale source d'enzymes industrielles : 50% proviennent des champignons et des levures, 35% des bactéries, alors que 15% sont d'origine végétale ou animale (**Barnabé et al., 2003**). L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par de nombreux paramètres difficiles à contrôler. Les principaux avantages des enzymes d'origine microbienne sont les suivants :

- Une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques ;
- Une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché ;
- Des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes par génie génétique et l'optimisation des conditions de production (**Amaud et al., 1993 ; Scriban, 1993**).

Les enzymes produites par les thermophiles et les hyperthermophiles (bactéries, champignons) sont habituellement thermostables, c'est-à-dire qu'elles sont résistantes à l'inactivation irréversible à des températures élevées. On les appelle thermozymes ou thermoenzymes (**Li et al., 2005**). Les enzymes produites par les mésophiles sont, quant à elles, connues sous le nom de mésozymes. Ces dernières ne sont souvent pas appropriées pour certains procédés industriels qui requièrent des conditions réactionnelles parfois rudes et particulières (température, pH, présence de solvants). Les thermozymes possèdent des avantages biotechnologiques par rapport aux mésozymes. Elles sont plus résistantes que les mésozymes à la dénaturation thermique et chimique (**Zrikus et al., 1998**). Elles sont plus faciles à purifier par traitement à la chaleur (**Li et al., 2005**). En raison de leur thermostabilité, les réactions catalysées par des thermozymes sont moins susceptibles d'être contaminées par des microorganismes et ont souvent des taux réactionnels plus élevés que les mêmes réactions catalysées par des mésozymes. Ainsi que, le fait d'opérer des procédés à des températures élevées entraîne une diminution de la viscosité du milieu réactionnel en plus d'augmenter la solubilité des substrats (**Bruins et al., 2001**).

Parmi les enzymes actives à des températures élevées d'intérêt industriel, les protéases, les lipases et d'autres hydrolases comme les cellulases, les chitinases et les amylases sans

oublier la taq polymérase (**Van den burg, 2003**). En effet, une des bactéries thermophiles les plus connues dont les enzymes ont trouvé une application industrielle, c'est *Thermus aquaticus*, bactérie thermophile aérobie, hétérotrophe, isolée en **1969** dans une source chaude du parc national de Yellowstone par le microbiologiste américain **Thomas Brock**.

2. Les hydrolases

Les hydrolases sont des enzymes de dégradation qui provoquent la coupure d'une molécule et fixent les radicaux H et OH de l'eau sur les valences libérées. Ces enzymes ne nécessitent pas généralement de coenzymes, elles sont activables par des cations. Elles interviennent sur les fonctions éthers, acétals, esters phosphoriques, liaisons O-O des peroxydes, C-N des amides (**Bornscheuer, 2002**).

2.1. Les protéases

Les enzymes protéolytiques ou les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui relie deux acides aminés dans une chaîne peptidique (**Benedykt et Katarzyana, 2008 ; Mukherjee et al., 2008 ; Reddy et al., 2008**). Elles appartiennent à la sous classe 4 de la classe 3 d'hydrolases (EC3.4.) (**Mala et al., 1998 ; Kumar et al., 2008**).

Les protéases sont classées en deux groupes, les protéases extracellulaires et les intracellulaires. Les protéases intracellulaires sont importantes pour une variété de processus cellulaires et métaboliques. Les protéases extracellulaires sont importantes pour l'hydrolyse des protéines dans l'environnement extérieur de la cellule (**Kalisz, 1988**). Ces dernières sont plus intéressantes à utiliser en industrie, car elles ne nécessitent pas d'étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction. Une centrifugation suffit pour les séparer des cellules (**Rao et al., 1998**). Elles se différencient également selon leur mode d'action en deux groupes, les endopeptidases et les exopeptidases (**Tableau 6**). Les exopeptidases agissent seulement sur les liaisons peptidiques proches des extrémités de la chaîne peptidique. Par contre, les endopeptidases sont caractérisées par leur action spécifique à l'intérieur de la chaîne peptidique (**Rao et al., 1998**).

La majorité des enzymes utilisées industriellement sont des endopeptidases. Celles-ci sont classées en quatre groupes selon la nature de leur site catalytique : Les protéases sérines (EC 3.4.21.x), les protéases cystéines (EC 3.4.22.x), les protéases aspartiques (EC 3.4.23.x),

et les métalloprotéases (EC 3.4.24.x). Ces dernières forment le groupe de protéases le plus varié (**Rambaud et al., 2004 ; Antranikian, 2009**).

Les métalloprotéases sont caractérisées par l'exigence en un cation divalent pour leur activité, la stabilité thermique de ces protéases augmente si les ions Ca^{++} sont ajoutés au milieu. Les métalloprotéases neutres montrent une haute spécificité vers les acides aminés hydrophobes. La plupart des métalloprotéases contient le motif His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH) (**Rao et al., 1998**). Ces protéases sont inactivées en présence d'agent chélateurs forts [ex : EDTA (*Ethylene Diamine TetraAcetate*)] ou phenanthroline (**Beynon et Oliver, 2004**). La thermolysine est une métalloprotéase neutre thermostable produite par *Bacillus stearothermophilus*. La collagénase est une autre métalloprotéases très spécifique, elle réagit seulement sur le collagène et la gélatine, elle est produite par *Achromobacter iophagus* et autres microorganismes dont les moisissures (**Rao et al., 1998**).

Tableau 6 : Classification des protéases (Rao et al., 1998).

Type de protéase	Classes et sous-classes
Exopeptidases	Aminopeptidases <ul style="list-style-type: none"> • Peptidy peptidases • Dipeptidyle peptidases • Tripeptidyle peptidases Carboxypeptidases <ul style="list-style-type: none"> • Sérine carboxypeptidases • Métallo-carboxypeptidases • Cystéine carboxypeptidases
Endopeptidases	Protéases sérines Protéases cystéines ou protéases thiols Protéases aspartiques ou protéases acides Métalloprotéases

Les enzymes protéolytiques sont omniprésentes dans tous les organismes vivants vue leur rôle essentiel dans la croissance cellulaire et dans la différenciation (**Gupta et al., 2002 ; Sandhya et al., 2005**). Cependant, la majorité des protéases commercialisées sont d'origine microbienne, car ces enzymes sont plus stables vis-à-vis de la température, du pH et de

certaines détergents par rapport aux protéases d'origine animale ou végétale (**Beg et al., 2002 ; Nascimento et Martins, 2004**). Beaucoup de travaux de recherche se sont intéressés à la production de protéases à partir de moisissures (**Belmessikh, 2012 ; Benkahoul, 2017**).

Les protéases sont les plus employées par rapport aux autres enzymes utilisées en biotechnologie (**Antranikian, 2009**), elles sont très recherchées dans la bio-industrie et l'agro-alimentaire. Elles représentent environ 65% (50 et 60 milliards d'euros par an) des ventes d'enzymes industrielles dans le marché mondial (**Sahoo et al., 2012**). Elles sont utilisées comme additives dans : les détergents de blanchisserie, la transformation des produits alimentaires, l'industrie pharmaceutique, la tannerie et dans la gestion des déchets (**Amoozegar et al., 2007 ; Karbalaie-Heidari et al., 2009**).

2.2. Les amylases

Les amylases (EC.3.2.1.x) sont des enzymes appartenant à la troisième classe, celle des hydrolases, de type endoglycanases. Elles agissent sur les liaisons (1,4) de l'amidon. En effet, les amylases catalysent la dégradation des polymères d'amidon pour produire des dextrans et différents gluco-oligosaccharides de longueurs variables (**Gupta et al., 2003**). Elles sont des métallo-enzymes à calcium. Ces ions sont nécessaires au maintien de la stabilité de la structure tertiaire de l'enzyme et à son activité (**Fogarty et al., 1980**).

Les amylases sont classées en deux catégories, endoamylases et exoamylases. Les endoamylases catalysent l'hydrolyse à l'intérieur de la molécule d'amidon d'une manière aléatoire. Cette action provoque la formation d'oligosaccharides linéaires et ramifiés de diverses longueurs de chaîne. Les exoamylases hydrolysent l'extrémité non réductrice, pour donner successivement des produits finaux plus courts (**Gupta et al., 2003**).

Les amylases proviennent de différentes sources (plantes, animaux et microorganismes). Aux cours de la dernière décennie. Des recherches considérables ont été entreprises avec l' α -amylase extracellulaire étant produite par une grande variété de micro-organismes (**Lonsane et al., 1990**). En effet, l' α -amylase [α -(1,4)-D- glucanohydrolase (E.C.3.2.1.1)] (**Graber, 1989**), est une endoamylase qui hydrolyse au hasard les liaisons osidiques (1,4), de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et du glycogène et l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes. Elle provoque la libération du glucose, du maltose et surtout des

dextrines (**Kelly et al., 1997**). Elle a été dérivée de plusieurs champignons et bactéries (**Pandey et al., 2000**). Les α -amylases de *Bacillus amyloliquefaciens* et d'*Aspergillus oryzae* sont des glycoprotéines et renferment 478 acides aminés répartis en 2 domaines globulaires appelés A (1-380 résidus) et B (381-478 résidus). Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobes (**Chiba, 1988**). En effet, les α -amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisés dans les procédés industriels : industrie alimentaire, pharmaceutique, textile, papeterie, et détergent, en raison de leur productivité et thermostabilité (**Behal et al., 2006**).

L'avantage majeur de l'utilisation des microorganismes pour la production des amylases est la capacité de produire à grande échelle ainsi que, la facilité de manipulation pour obtenir des enzymes avec des caractéristiques souhaitées (**Lonsane et al., 1990**).

Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie (**Gupta et al., 2003**). Elles représentent environ 25 à 33% du marché mondial des enzymes (**Saxena et al., 2007**). En effet, les amylases possèdent une gamme étendue d'applications tels que les industries de la saccharification d'amidon, le textile, les aliments, le boulangerie, le brassage et la distillation (**Gupta et al., 2003**). En raison de l'importance industrielle de cette enzyme, un intérêt est porté à l'isolement de nouvelles amylases appropriées à applications industrielles nouvelles (**Burhan et al., 2003**).

2.3. Les cellulases

Les cellulases [1,4-(1,3;1,4)- β -D-Glucanohydrolase] sont des enzymes qui peuvent hydrolyser la cellulose en sucres simples en formant un système enzymatique complexe (**Kader, 1999 ; Korish, 2003**). Elles appartiennent à une classe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons 1, 4 β -D glycosidiques (**Beguin et Aubert, 1994**).

Les cellulases sont classées selon leurs structures. En effet, pour l'hydrolyse totale de la cellulose, il existe trois types d'activités enzymatiques cellulolytiques complémentaires (**Scriban, 1993**).

- **Les endo-1,4- β -glucanases:** ces endoglucanases coupent aléatoirement les liaisons oglycosidiques internes donnant ainsi des chaînes glucanes de différentes longueurs.
- **Les exo-1,4- β -D-glucanases:** ces exoglucanases agissent de façon processive sur les extrémités libres des chaînes de cellulose libérant du β -cellobiose comme produit final.

- **Les β -glucosidases:** qui hydrolysent les disaccharides « β -cellobiose » et produisent le glucose (**Bayer *et al.*, 1994 ; Singh, 1999**).

Les endoglucanases et les cellobiohydrolases agissent directement sur le substrat solide après adsorption sur celui-ci tandis que, les β -glucosidases agissent en milieu homogène sur le substrat soluble (**Bayer *et al.*, 1994**).

Les cellulases sont principalement produites par les champignons dont les moisissures, les bactéries et autres organismes cellulolytiques (**Beguin et Aubert, 1994 ; Kader, 1999 ; Korish, 2003**). La majorité des cellulases microbiennes étudiées sont des glycoprotéines, avec un taux élevé en acides aminés acides (**Beldman *et al.*, 1985**) et ne sont pas des métalloprotéines (**Saha *et al.*, 1994**). Elles ont généralement une structure modulaire avec deux domaines fonctionnels distincts: le site catalytique et le site de fixation du substrat, habituellement reliés entre eux par un peptide glycosylé flexible riche en sérine, proline et thréonine appelé «linker» (**Hasper *et al.*, 2002 ; Receveur *et al.*, 2002**).

Les cellulases représentent environ 20 % du marché mondial des enzymes (**Bhat, 2000 ; Miettinen-Oinonen, 2004 ; Wang *et al.*, 2004 ; Lekchiri *et al.*, 2006**). Elles possèdent un large éventail d'applications dans les industries du textiles pour le bioblanchiment des tissus et aussi dans les détergents de blanchisserie utilisés pour ramollir les tissus (**Kaur *et al.*, 2007 ; Aygan et Arikani, 2008**). L'intérêt porté aux cellulases augmente également dans la production du bioéthanol comme les enzymes qui sont employées pour hydrolyser les matériaux cellulosiques prétraités pour les sucres fermentescibles (**Wang *et al.*, 2009**).

2.4. Les pectinases

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases sont des enzymes qui se caractérisent par leurs pouvoir de dégrader la pectine (**Martinez-Trujillo *et al.*, 2011**). Elles forment un groupe unique, complexe et hétérogène de différentes enzymes agissant spécifiquement sur les substrats pectinolytiques, notamment les polymères de pectine. Ces dernières représentent le polysaccharide majeur de la paroi cellulaire primaire et la lamelle moyenne de la paroi végétale (**Tatianadacosta et Flevo, 2005**). Alors, cette action se résume dans le clivage de l'acide polygalacturonique (PGA) en acide monogalacturonique, ouvrant ainsi les liaisons glycosidiques, réduisant l'adhésion intracellulaire et la rigidité tissulaire (**Fogarty et Kelly, 1980 ; Tatianadacosta et Flevo, 2005**). Ce qui aboutit par conséquent à la dégradation de la

paroi cellulaire, l'éclatement des cellules, et donc, au symptôme de macération (**Bateman et Basham, 1976**).

Les enzymes pectinolytiques sont classées en trois grands groupes, selon leurs modes d'action sur l'acide polygalacturonique (PGA) (unité fondamentale de la pectine), à savoir : les protopectinases, les estérases et les dépolymérases. Les protopectinases sont des enzymes ayant pour rôle de dégrader la protopectine insoluble et donner naissance à des pectines solubles hautement polymérisées ; les estérases catalysent la désestérification des pectines par l'élimination des esters méthoxyles, et les dépolymérases catalysent le clivage hydrolytique des liaisons α -(1-4)-glycosidiques de l'acide D-galacturonique (**Jayani et al., 2005**).

La plupart des préparations commerciales de pectinases sont d'origine microbienne notamment fongique. Cependant, l'espèce *Aspergillus niger* est la source fongique la plus communément utilisée pour la production industrielle d'enzymes pectinolytiques (**Jayani et al., 2005 ; Dinu et al., 2007**).

Les pectinases microbiennes représentent 25% des ventes mondiales d'enzymes alimentaires (**Jayani et al., 2005**). Dans les industries agroalimentaires, elles sont utilisées en association avec les amylases pour clarifier les jus et réduire ainsi le temps de filtration de 50% (**Saxena et al., 2008**), elles sont utilisées également comme complément alimentaire dans l'alimentation animale (**Rodriguez-Fernández et al., 2011**). Les pectinases peuvent être utilisées dans divers domaines tels que, le textile, l'industries du papier, la fermentation du cacao, la confection et la maturité du thé, l'extraction des pulpes à partir des fruits et des légumes, ainsi que le traitement des eaux usées (**Zeni et al., 2015**).

3. Les enzymes d'origine microbienne et leurs applications industrielles

L'utilisation des microorganismes dans la production des enzymes est utilisée depuis de longue date par l'homme. Les applications d'extraits naturels comprenant des enzymes remontent également à longtemps. L'enzyme est un outil technologique qui permet des transformations dans un milieu défini, elle permet la fabrication de composés qui ensuite seront purifiés. Ces enzymes confèrent au milieu des propriétés nouvelles ou permettent l'élimination d'un élément de milieu ou en fin la formation d'un produit (**Monson, 1985**).

Le **tableau 7** récapitule quelques exemples d'enzymes d'origine microbienne et leurs applications industrielles.

Tableau 7: Applications industrielles des enzymes d'origine microbienne
(Aviron-Violet *et al.*, 1982).

Enzymes	Microorganisme utilisés	Usages
Protéases	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus mucor</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Clostridium spp.</i> <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Hydrolyse de protéines et de la gélatine Clarification de la bière Tannerie Blanchisserie Détergents
Amylases	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus roqueforti</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Saccharification de l'amidon Boulangerie, conserve de fruits, textiles, papeterie Industries alimentaires Industrie alimentaires
Cellulases	<i>Trichoderma karauangi</i> <i>Myrothecium verrucarium</i>	Dégradation des aliments celluloseux, Textiles
Pectinases	<i>Aspergillus spp.</i> <i>Penicillium spp.</i> <i>Botrytis psp.</i>	Clarification des jus de fruit et des vins, industrie textile, accélération des filtrations
Invertases	<i>Saccharomyces carlbergensis</i>	Confiserie
Lipases	<i>Candida lipolytica</i>	Fromagerie, laiterie
Lactases	<i>Candida speudotropicallis</i>	Crème glacées
Penicillinases	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus anthracis</i>	Destruction de la pénicilline
Catalases	<i>Acetobacter peroxydans</i>	Fabrication de matériaux poreux

Matériel & Méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Sol et eau

1.1.1. Présentation du site de prélèvement

Les échantillons (sol et eau) utilisés au cours de notre étude ont été prélevés le 10 février 2018 à Hammam Debegeh, Guelma, Algérie.

Hammam Debegeh (appelé aussi Meskhoutine) est situé à 20 km au Sud du Chef-lieu de la Wilaya de Guelma (36°27'N, 7°16'E) et à 320m d'altitude (**Figure 3**). Le site comprend neuf sources d'eau hyperthermale, les plus chaudes d'Algérie, atteignant jusqu'à 98°C au point d'émergence de l'eau. L'eau est de nature saline, bicarbonatée calcique et chlorurée sodique, avec dégagement d'hydrogène sulfuré. Elle est exploitée par les stations thermales environnantes (**Boughlali, 2003**).



Figure 3 : Localisation de Hammam Debegeh- Guelma (Source : Google earth).

1.1.2. Prélèvement des échantillons

Les échantillons (sol et eau) ont été prélevés dans les mêmes conditions d'asepsie et récupérés dans des flacons en verre stériles à raison de deux flacons pour chaque prélèvement, transportés dans une glacière puis conservés à 4°C.

- **Sol**

Le prélèvement du sol est réalisé au niveau d'une roche avoisinant la source d'eau chaude à une distance approximative de trois mètres, à l'aide d'une spatule stérile. La couche des trois premiers centimètres est écartée (**Buhot, 1973 ; Mihail et Ailcorel 1987 ; Saadoune et Momani, 1997**). Cent à cent-cinquante (100-150) g du sol sont recueilli dans des flacons stériles (**Tableau 8**).

- **Eau**

Les échantillons d'eaux, ont été prélevés à différents niveaux :

A : Au niveau d'une source d'eau thermale dont la température est égale à 98°C.

B : Au niveau d'une source d'eau thermale située juste à côté de la première (96°C).

C : Au niveau d'un point avoisinant la source d'eau thermale à une distance approximative de un mètre (65°C).

D : Au niveau d'un point avoisinant la source d'eau thermale à une distance approximative de quatre mètres dont la température est égale à 45°C (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Tableau représentatif du site de prélèvement des échantillons (sol et eau).

Wilaya	Guelma				
Site d'échantillonnage	Hammam Debegh				
Type d'échantillon	Sol	Eau			
		A (98°C)	B (96°C)	C (65°C)	D (45°C)
Photos					

1.2. Isolement des microorganismes

Pour préparer la suspension mère du sol, 10g de l'échantillon sont dissouts dans 90ml d'eau physiologique stérile (**Annexe 1**). Une homogénéisation de la suspension est effectuée pendant 30min à l'aide d'un agitateur vortex.

Pour chaque type d'échantillon (sol et eau), une série de dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) est préparée à partir de la solution mère.

Cent microlitre de chaque dilution sont étalés à la surface des deux milieux gélosés : PDA (Potatos Dextrose Agar) et GN (Gélose Nutritive) (**Annexe 2**). Le premier est additionné stérilement d'un antibiotique (la gentamicine à 0.04mg/ml) et ce pour empêcher la croissance des bactéries et favoriser le développement des champignons (**Leveau et Bouix, 1993 ; Tarr, 2004**). Le second milieu est utilisé pour isoler les bactéries. Trois répétitions par boîte de Pétri sont réalisés.

Après ensemencement, les boîtes de Pétri (PDA) sont incubées à 30°C et 45°C. Des observations quotidiennes sont effectuées durant les deux semaines. Les boîtes de Pétri (GN) sont quant à elles incubées à 45°C pendant 24 à 48 heures.

Après incubation et développement des différentes souches, des repiquages successifs sont effectués pour purifier les souches jusqu'à obtention de clones purs dans chaque boîte de Pétri (**Giraud, 1998**). Le repiquage s'est fait sur les mêmes milieux du départ (PDA toujours supplémentés par la gentamicine, pour les champignons et GN pour les bactéries).

La conservation des souches fongiques est réalisée par la méthode la plus simple et la plus utilisée au laboratoire. Il s'agit de repiquer les souches en tubes sur gélose inclinée (PDA) pendant 5 à 7 jours puis à 4°C, pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (**Ui-haq et al., 2002**). La conservation des bactéries est effectuée en tubes sur gélose inclinée (GN). Après 24 heures d'incubation, les cultures sont conservées à 4°C (**Figure 4**). Il faut signaler que l'échantillon « eau » thermal suit pratiquement le même schéma que l'échantillon « sol » aussi bien dans l'isolement que dans la purification des différentes souches (**Figure 5**).

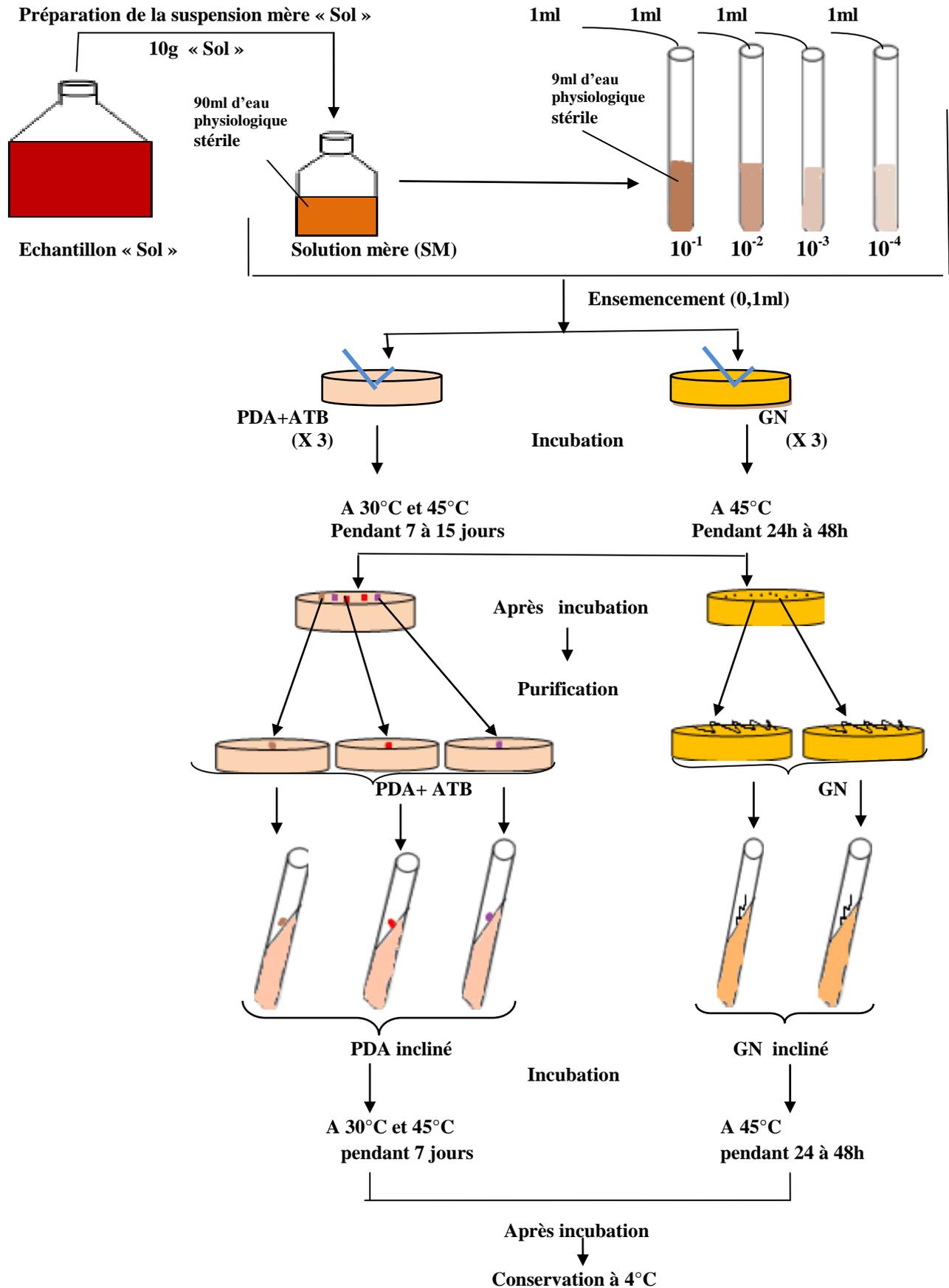


Figure 4 : Schéma d'isolement des microorganismes à partir de l'échantillon « Sol ».

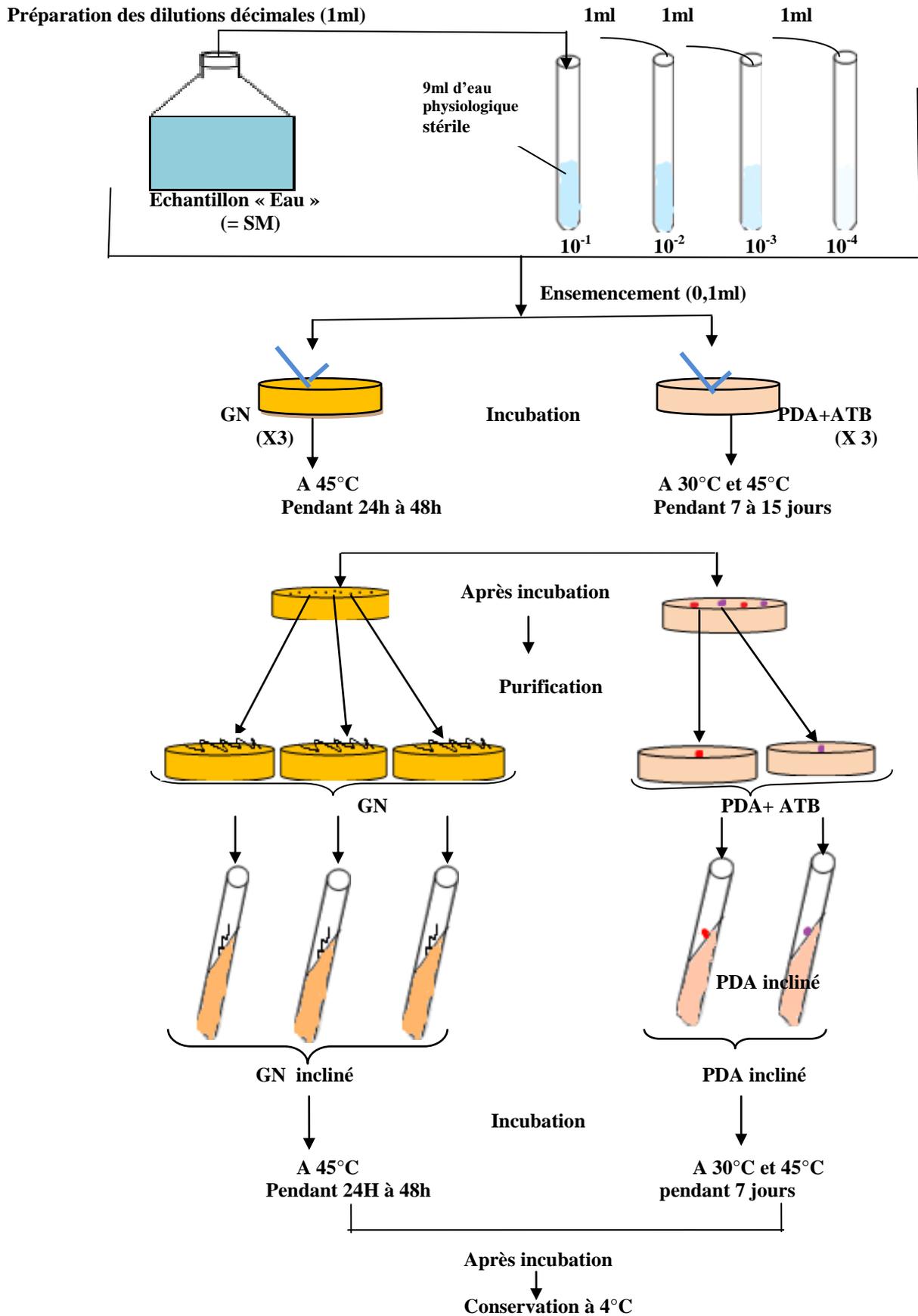


Figure 5 : Schéma d'isolement des microorganismes à partir de l'échantillon « Eau ».

2. Mise en évidence des activités enzymatiques

2.1. La recherche de l'activité protéolytique (hydrolyse des protéines)

2.1.1. Chez les champignons

La gélose au lait (lait à 20% d'agar) (**Annexe 3**) est utilisée pour la mise en évidence de la présence d'une activité protéolytique chez les souches fongiques (**Clarke et Steel, 1966**). L'ensemencement se fait par touche centrale et l'incubation est effectuée à deux températures, 30°C et 45°C, pendant 5 à 7 jours pour les moisissures et à 30°C durant 3 à 5 jours pour les levures. La gélose au lait est choisie pour ses avantages tels que la simplicité dans la préparation, la richesse en protéines et son faible coût (**Smith et al., 1952**).

La dégradation de la caséine du lait se caractérise par l'observation visuelle et directe d'une zone claire et transparente autour de la colonie (**Harrigan et Mccance, 1976**).

L'activité est significative si le diamètre de la zone de lyse est supérieur ou égale à 3mm. Les diamètres des colonies et des zones d'hydrolyse sont quotidiennement mesurés (Chez les moisissures jusqu'au septième jour et trois jours pour les levures) (**Ronald et Harold, 1970**).

2.1.2. Chez les bactéries

Le milieu gélosé contenant 5% du lait écrémé (**Annexe 3**) est utilisé pour les bactéries dans la mise en évidence d'une présence d'une activité protéolytique (**Gordon et al., 1973 ; De Vos et al., 2009**). L'incubation a lieu à 45°C pendant 48h.

L'hydrolyse des protéines du lait est indiquée par la présence d'une zone claire autour de la strie, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (**Gordon et al., 1973 ; De Vos et al., 2009**).

2.2. La recherche de l'activité amylolytique (Hydrolyse de l'amidon)

2.2.1. Chez les champignons

Le milieu PDA contenant de l'amidon soluble à 1% (**Annexe 3**) est utilisé pour la sélection des souches amylolytiques (**Tatsinkouet et al., 2005**). Les boîtes sont incubées à 30°C et 45°C pendant 5 à 7 jours pour les moisissures et à 30°C durant 3 à 5 jours pour les levures.

Après incubation, le milieu gélosé est recouvert d'une solution de lugol (**Annexe 4**), pendant 30 secondes suivie d'un rinçage avec de l'eau distillée. L'eau iodée contenant l'iode se complexe avec l'amidon présent dans le milieu et donne un précipité bleu sombre.

L'hydrolyse de l'amidon est indiquée par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie productrice d'amylase (Tatsinkou *et al.*, 2005).

2.2.2. Chez les bactéries

Ce test est réalisé en cultivant les souches bactériennes sur milieu gélose nutritive contenant 1% d'amidon soluble (Annexe 3) (De Vos *et al.*, 2009). Les boîtes sont incubées à 45°C pendant 48h.

Après incubation, la gélose est traitée de la même manière que dans le cas précédent chez les champignons. La présence d'une activité amylolytique se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des colonies (absence de coloration autour des colonies). A l'inverse, un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture (Les zones contenant de l'amidon se colorent en brun) (Gordon *et al.*, 1973 ; De Vos *et al.*, 2009).

2.3. La recherche de l'activité cellulolytique (Hydrolyse de la cellulose)

2.3.1. Chez les champignons

Le milieu carboxyméthylcellulose agar (CMC) (Annexe 3) est utilisé pour la mise en évidence de l'activité cellulolytique chez les souches testées (Oikawa, 1998 ; Korish, 2003). Les boîtes sont incubées à 30°C et 45°C pendant 5 à 7 jours pour les moisissures et à 30°C durant 3 à 5 jours pour les levures.

Après croissance, les boîtes sont colorées avec une solution au rouge Congo (0.1%) (Annexe 4). Ce dernier se fixe sélectivement sur les polymères de cellulose. Après 30 minutes de réaction à température ambiante, les boîtes sont lavées avec une solution de NaCl (1M) (Annexe 1) pendant une heure. Le « rouge Congo » permet la mise en évidence de l'activité cellulolytique par l'apparition de zones claires autour des colonies productrices de cellulase (Oikawa, 1998 ; Korish, 2003).

2.3.2. Chez les bactéries

Le milieu de base supplémenté par 0,5% (w/v) de carboxyméthylcellulose (CMC) (Annexe 3) est utilisé pour sélectionner les souches bactériennes ayant une activité cellulolytique (Bragger *et al.*, 1989). Les boîtes sont incubées à 45°C pendant 48h.

Après incubation, les boîtes de Pétri sont remplies d'une solution de rouge Congo à 0,1% (w/v) (Annexe 4) et placées pendant 15 à 30 minutes à 45°C. Les boîtes sont lavées par une solution à 1M de NaCl pendant 5 à 10 minutes à température ambiante avant la lecture. La

production de cellulase est appréciée par l'apparition de zones claires autour des colonies (**Bragger *et al.*, 1989**).

2.4. La recherche de l'activité pectinolytique (Hydrolyse de la pectine)

2.4.1. Chez les champignons

Les souches pectinolytiques sont sélectionnées sur le milieu pectine agar (**Annexe 3**). Après incubation à 30°C et 45°C pendant 5 à 7 jours pour les moisissures et à 30°C pendant 3 à 5 jours pour les levures, les boîtes sont inondées par une solution aqueuse d'acétate de cuivre à 7.5% (**Annexe 4**) pendant 10 minutes. L'acétate de cuivre donne une couleur bleue claire sur la gélose qui contient la pectine non dégradée (**Snaiki *et al.*, 2006**).

L'activité pectinolytique se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies productrices.

2.4.2. Chez les bactéries

Le milieu pectine agar (**Annexe 3**) est utilisé pour la sélection des souches bactériennes productrices de la pectinase. Après incubation à 45°C pendant 48h, les boîtes sont inondées par une solution d'acétate de cuivre à 75% (**Annexe 4**) pendant 10 minutes. Un résultat positif se traduit par un halo clair autour des stries. A l'inverse, un résultat négatif se manifeste par l'absence de ce dernier (**Snaiki *et al.*, 2006**).

3. Identification des microorganismes sélectionnés

3.1. Identification des moisissures sélectionnées

L'identification des souches fongiques sélectionnées est basée sur l'étude morphologique par observation de l'aspect macroscopique et microscopique.

3.1.1. Identification macroscopique

Cette observation permet de déterminer les quatre caractères culturels suivants : la vitesse de croissance, la texture, la couleur du thalle, la couleur du revers de la culture et l'odeur (Harrigan et Mccance, 1976 ; Rinaldi *et al.*, 1998 ; Botton *et al.*, 1999).

3.1.2. Identification microscopique

L'identification microscopique des champignons repose sur plusieurs méthodes, les deux méthodes utilisées sont celles du scotch (test du drapeau) pour les cultures filamenteuses et poudreuses et la méthode du lactophéno-bleu de coton (Chabasse *et al.*, 2002).

- **Méthode de scotch**

Un petit morceau de scotch est appliqué par la face collante sur la colonie à l'aide d'une pince puis déposé sur une lame porte-objet (Chabasse *et al.*, 2002).

- **Coloration par le lactophéno-bleu coton**

Un fragment de la colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame porte-objet dans une goutte de colorant du lactophéno-bleu coton (Annexe 5), recouvert d'une lamelle couvre-objet qui écrase la préparation (Chabasse *et al.*, 2002).

L'observation microscopique est réalisée au microscope optique au grossissement X40 et X100. Ce type d'identification est basé sur l'étude morphologique du mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation,...) et des spores (forme, couleur, texture des parois,...) (Harrigan et Mccance, 1976 ; Oteng-Gyang, 1984 ; Guiraud, 1998).

3.2. Identification de la levure sélectionnée

L'identification ne peut être effectuée que sur une souche en culture pure préalablement isolée sur un milieu gélosé pour levures.

3.2.1. Etude des caractères macroscopiques

L'observation des colonies sur milieu solide, après incubation à 30°C pendant 48 à 72h permet l'étude de la taille, la forme et la pigmentation des colonies de levures (**Leveau, 1979; Bourgeois, 1996**).

3.2.2. Etude des caractères microscopiques

L'examen microscopique à l'état frais (grossissement X40 et/ou grossissement X100) permet l'étude de la forme des cellules (soit sphérique, ovoïde, allongée), le mode de reproduction (végétative par scissiparité ou bourgeonnement) et la position (Polaire, latérale) du (ou des) bourgeon (s) sur la cellule mère (**Leveau, 1979 ; Bourgeois, 1996**).

3.3. Identification des bactéries sélectionnées

3.3.1. Identification macroscopique

C'est une description directe faite sur boîtes d'isolement, permettant au moins une distinction des souches les unes des autres afin de les purifier. Elle permet de déterminer l'aspect macroscopique des colonies (forme, aspect, couleur, contour, taille, etc.) (**Badis et al, 2005**). L'identification macroscopique des bactéries se fait après leur croissance sur milieu GN et leur incubation à 45°C pendant 24 h.

3.3.2. Identification microscopique

L'observation microscopique s'effectue à l'aide d'un microscope optique.

- **Observation à l'état frais :**

Elle permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie, de leur mode de regroupement et de leur mobilité. La méthode consiste à déposer une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile sur la lamelle, puis apporter et dissocier dans la goutte un prélèvement bactérien de la colonie à observer; la lamelle est recouverte par une lame creuse de la manière à obtenir une goutte pendante et l'observation est faite à différents grossissements (X40 et à l'immersion) (**Singleton, 2005**).

- **Coloration de Gram:**

Décrite par **Gram** en **1884**. Elle permet de distinguer deux grands groupes bactériens : les bactéries à Gram négatif, se colorent en rose et les bactéries à Gram positif, apparaissent

violettes (**Berraho, 2009**). Ainsi que la précision de la morphologie et le mode de regroupement des colonies.

Sur chacune des lames dont les souches sont fixées, quelques gouttes de violet de gentiane (**Annexe 6**) sont déposées et laissées agir pendant 1min. Après rinçage avec de l'eau de robinet, du lugol (**Annexe 6**) est redéposé pendant 1min pour le mordantage. Ensuite, la décoloration est faite par l'alcool à 95° pendant 30secondes puis un autre rinçage est effectué. Enfin, un deuxième colorant (fuschine de Ziehl) (**Annexe 6**) est déposé pendant 30secondes (**Larpent, 1990**).

Après le dernier lavage et séchage des lames, l'observation est réalisée au microscope optique (10 X 100) par l'ajout d'une goutte d'huile d'immersion.

3.3.3. Tests biochimiques

- **Recherche du type respiratoire sur milieu VF (Viande-Foie)**

La détermination du type respiratoire s'effectue sur la gélose viande foie semi-solide 0,6% à une valeur de pH de 7,6 (**Annexe 7**). Le milieu est régénéré au bain-marie à 95°C, suivi d'un abaissement de la température à 45°C, coulé dans des tubes à essai stériles. Les tubes sont ensuite inoculés à l'aide d'une pipette boutonnée et incubés à une température de 45°C pendant 24heures (**Prescott, 2002**).

- **Test de Catalase**

Il s'agit de la recherche de la catalase, enzyme responsable de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit par la souche. Son principe consiste à mettre en contact une colonie de l'isolat en présence d'eau oxygénée. Une effervescence due à un dégagement gazeux traduit la présence de cette enzyme (**Joffin et Leyral, 2006 ; Tankeshwar, 2013**).

- **Test de l'Oxydase**

Le cytochrome oxydase est une enzyme qui intervient à la fin de la chaîne respiratoire. Elle permet la fixation de l'hydrogène et des électrons sur l'oxygène. Sa production est mise en évidence par des disques « Ox » imprégnés d'oxalate N-N-diméthylparaphénylène.

Une quantité suffisante de culture est déposée sur le disque imbibé d'eau distillée. Une couleur bleu violacée se manifeste en quelques minutes si la réaction est positive (**Joffin et Leyral, 2006 ; Delarras, 2014**).

- **Test de nitrate réductase**

Ce test consiste à mettre en évidence la réduction des nitrates en nitrites par l'enzyme nitrate réductase. Il est réalisé selon le protocole mentionné dans le Bergey's Manuel of Systematics (De Vos *et al.*, 2009). Les souches sont cultivées sur bouillon nitraté, après incubation à 45°C pendant 48 heures, trois gouttes de chacun des réactif NIT I (acide parasulfanilique 0,8 g en 5 N acide acétique) et NIT II (dimethyl-a-naphthylamine 0.6 ml ; acide acétique 100 ml), appelés aussi réactif de GRIESS, sont ajoutées à la culture. Un résultat positif est mis en évidence par l'apparition d'une coloration rouge. En absence de cette dernière, quelques milligrammes de la poudre de zinc sont additionnés. S'il y a une Apparition de la coloration rouge, les nitrates sont encore présents dans le milieu et sont réduits en nitrites par le zinc, donc la souche ne possède pas la Nitrate réductase. En cas d'absence de cette coloration, les nitrates sont réduits par les bactéries jusqu'au stade azote, donc la souche possède la Nitrate réductase.

- **Test Mannitol-Mobilité**

La mobilité des souches ainsi que la fermentation du mannitol sont testés sur le milieu semi-solide Mannitol-Mobilité (Annexe 7). La mobilité est interprétée par un envahissement du milieu à partir de la pique d'inoculation et la fermentation du mannitol est traduite par un virage de la couleur du milieu de culture en jaune (Harley et Prescott, 2002).

- **Utilisation des sucres sur milieu TSI (Triple Sugar Iron)**

La fermentation du glucose avec production d'acide, l'oxydation du saccharose et/ou du lactose, la libération d'H₂S et de CO₂ sont appréciées sur le milieu Triple Sugar Iron (TSI) (Annexe 7) (Harley et Prescott, 2002).

3.3.4. Test de thermo-résistance

Ce test est une confirmation de la présence de structures sporales. Des cultures bactériennes sont effectuées dans des tubes, contenant du bouillon nutritif, et incubées à 45°C pendant 24h. Des dilutions sont réalisées dans de l'eau physiologique à partir des cultures précédentes et elles sont chauffées dans un bain Marie à 80°C pendant 12 minutes suivi d'un refroidissement immédiat dans de l'eau froide. Un volume de 1ml de chaque dilution est ensuite ensemencé sur gélose nutritive en boîte. La lecture est faite après incubation à 45°C pendant 24 à 48h.

3.3.5. Culture sur milieux sélectifs

L'observation des colonies peut être d'un grand intérêt taxonomique lorsque la culture est faite sur des milieux spécifiques faisant apparaître certains caractères propres tels que les milieux : Hektoen, Chocolat, Chapman et Gélose à sang frais.

- **Culture sur milieu Hektoen**

La gélose Hektoen (**Annexe 8**) est un milieu sélectif utilisé afin d'isoler des Salmonelles et des Shigelles (**Guiraud, 1998**).

- **Culture sur milieu Gélose au sang cuit (chocolat)**

La Gélose au sang cuit (**Annexe 8**) est un milieu d'isolement enrichi préconisé pour l'étude des *Neisseria* notamment *Neisseria méningicoque*. Il est aussi utilisé pour la culture de *Haemophilus influenza* (**Guiraud, 1998**).

- **Culture sur milieu Chapman**

Le milieu de Chapman (**Annexe 8**) est un milieu sélectif, surtout utilisé en microbiologie médicale, permettant la croissance des germes halophiles. La forte concentration en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plupart des bactéries autres que les staphylocoques (**Biorad, 2007**).

- **Culture sur milieu Gélose au sang**

La gélose au sang (**Annexe 8**) permet le développement de la plupart des Streptocoques car ces derniers ne se multiplient pas convenablement sur les milieux courants tels que le bouillon nutritif ou la Gélose nutritive ordinaire. Cette gélose permet l'étude de leur caractère hémolytique (**Guiraud, 1998**).

Résultats & Discussion

1. Isolement des microorganismes

Les résultats concernant l'isolement des souches sont représentés dans le **tableau 9** ci-dessous. On note la présence de onze moisissures, une levure et treize bactéries.

Tableau 9 : Nombre de souches fongiques et bactériennes isolées depuis les échantillons.

Echantillons		Nombre de souches des champignons à 30°C		Nombre de souches des champignons à 45°C		Nombre de souches des bactéries à 45°C
		Moisissure	Levure	Moisissure	Levure	
Sol		9	1	2	/	3
Eau	A (98°C)	/	/	/	/	5
	B (96°C)	/	/	/	/	2
	C (65°C)	/	/	/	/	2
	D (45°C)	2	/	2	/	1

/ : Absence de souches

Malgré la température élevée de l'écosystème où les prélèvements ont été effectués, on note la présence d'un nombre non négligeable de microorganismes. En effet, la recherche d'enzymes thermorésistantes synthétisées par des microorganismes appartenant à des milieux extrêmes est de plus en plus sollicitée.

D'après le **tableau 9**, le plus grand nombre des souches fongiques incubées à 30°C est obtenu à partir de l'échantillon « sol », tandis qu'un faible nombre est obtenu à partir de l'échantillon « eau ».

Ce résultat peut s'expliquer par la richesse du sol en nutriments nécessaires à la croissance microbienne. Il y a aussi le facteur température. En effet la température élevée de l'échantillon d'eau par rapport à l'échantillon du sol limite la croissance de certains microorganismes d'où le nombre comparablement faible. Deux souches uniquement (par leur forme sporulée) peuvent résister à des températures élevées. En effet, **Jouani et Yiannicouris (2002)** signalent que la croissance fongique est régie par de nombreux paramètres physico-chimiques. La différence de la température peut être à l'origine du changement de la flore fongique d'un échantillon à un autre.

En outre, les deux souches de moisissures (*Aspergillus sp.1* et *Aspergillus sp.2*) isolées depuis l'eau thermale sont aussi présentes dans le sol avec les sept autres moisissures. Sachant que, les deux milieux sont de nature physicochimique différente, ceci nous permet de dire que les deux moisissures sont capables de se cultiver aussi bien dans le sol que dans l'eau.

Le même résultat est observé chez les deux autres moisissures obtenu à 45°C. D'après l'observation macroscopique, Il s'agit du genre *Aspergillus*. Un résultat qui doit être confirmé par l'observation microscopique (voir plus loin).

Malgré toutes les précautions prises pour l'isolement des souches fongiques, nous avons remarqué la présence de quelques colonies bactériennes notamment dans les boîtes incubées à 30°C. En effet, ces petits inconvénients sont dus probablement à la résistance de ces microorganismes aux conditions imposées. Cependant, leur disparition est observée suite aux repiquages consécutifs nécessaires à la purification des souches fongiques par l'ajout de l'antibiotique.

Par ailleurs, nous avons également remarqué la présence de souches bactériennes dans les deux milieux avec un nombre de treize. L'étude de **Gomri en 2012** a permis d'obtenir un nombre plus important. Les raisons sont selon nous dus à différents facteurs à savoir, l'utilisation d'un seul milieu dans l'isolement et la purification ce qui limite la croissance d'autre bactéries présentes initialement dans le milieu de prélèvement. La différence entre la température d'incubation dans notre cas (45°C) et la température (55°C) dans le travail de **Gomri en 2012**, est aussi un détail à ne pas négligé et qui peut participer à l'explication des différences obtenues dans le nombre des bactéries dans les deux travaux.

Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles sont classés selon leur optimum de température de croissance. Les classifications précédentes se basées sur le concept de thermophilie, de thermotolérance et des intervalles minimal et maximal de croissance étant trop restrictives, elles ont été écartées (**Mesbah et Wiegel, 2008 ; Wagner et Wiegel, 2008**). Ils sont ainsi classés en thermophiles modérés (50° à 70°C), thermophiles extrêmes (70°C à 80°C) et hyperthermophiles (>80°C) (Stetter, 1996). En se basant sur cette définition, nos souches sont qualifiées de thermophiles modérées. Généralement, c'est le cas de la majorité des bactéries isolées (**Logan et Halket, 2011**).

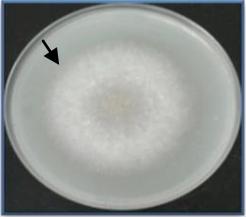
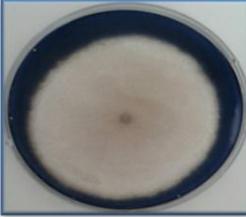
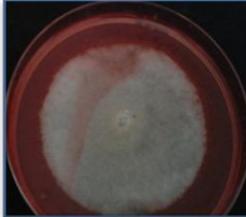
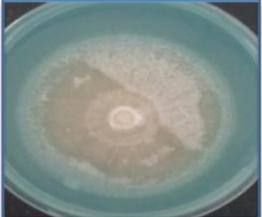
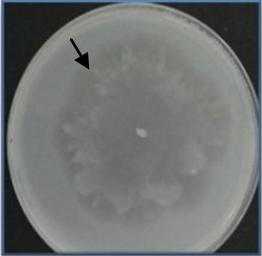
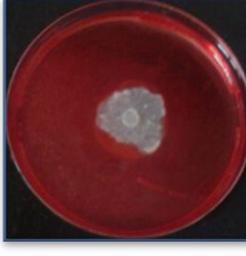
2. Mise en évidence des activités enzymatiques

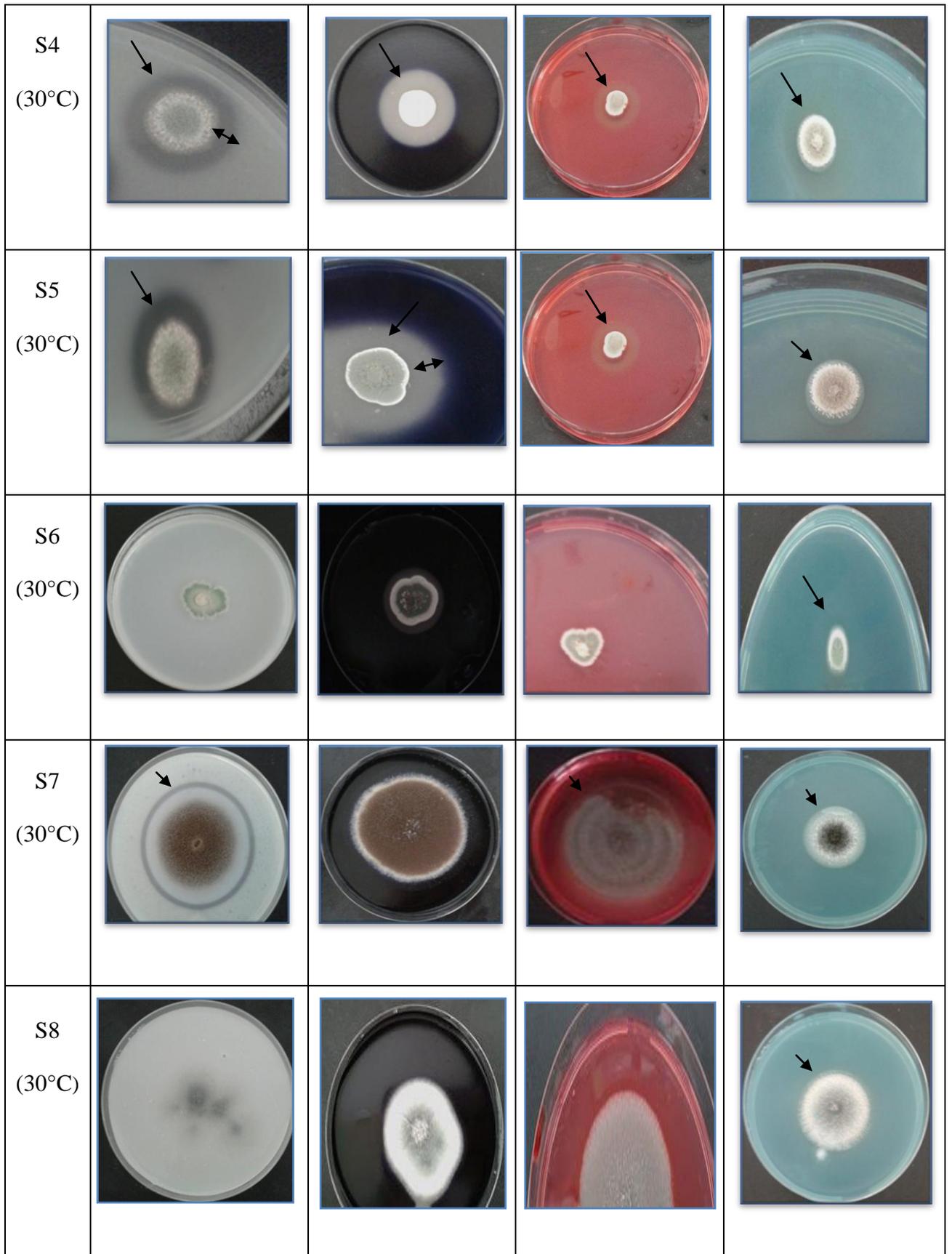
2.1. Chez les champignons

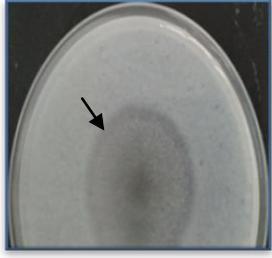
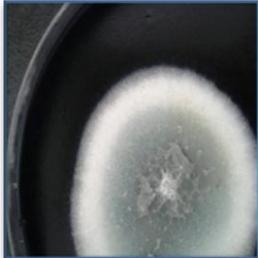
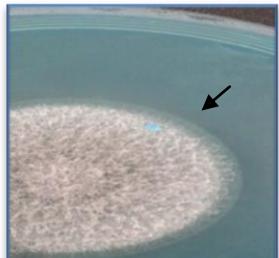
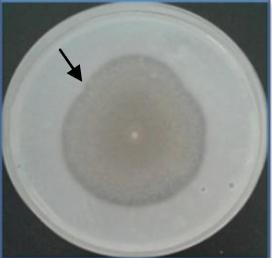
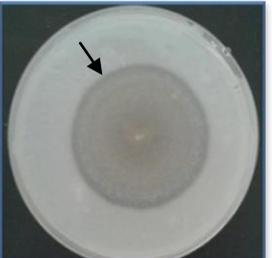
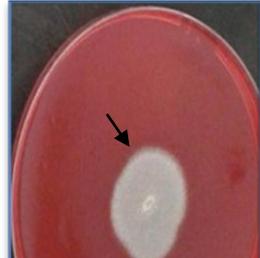
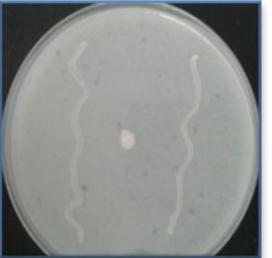
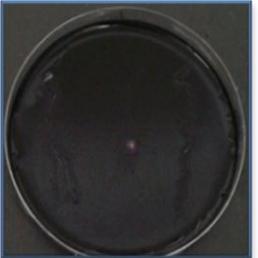
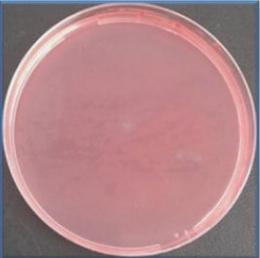
Le choix des milieux de culture est déterminant dans la mise en évidence de l'activité enzymatique recherchée et surtout dans le choix du substrat inducteur. Pour cela, on a utilisé les milieux gélosés : gélose au lait à 20% d'agar, PDA à amidon à 1%, CMC-agar et pectine-agar comme milieux sélectifs pour la détection des activités : protéolytique, amylolytique, cellulolytique et pectinolytique respectivement, chez les douze (12) souches fongiques isolées et testées (onze moisissures et une levure).

Les résultats obtenus après 5 jours d'incubation à 30°C et 45°C sont résumés dans le **tableau 10**. Par ailleurs, l'apparition des zones d'hydrolyse chez certaines souches prouve la production des enzymes hydrolases recherchées.

Tableau 10 : Zones d'hydrolyses des souches fongiques testées après 5 jours incubation.

Souche	Protéase	Amylase	Cellulase	Pectinase
S1 (30°C)				
S2 (30°C)				
S3 (30°C)				



S9 (30°C)	 A petri dish with a light-colored agar surface. A small, dark, circular spot is visible in the center, indicated by a black arrow pointing to it from the left.	 A petri dish with a dark agar surface. A bright, circular spot is visible in the center.	 A petri dish with a red agar surface. A small, dark, circular spot is visible in the center, indicated by a black arrow pointing to it from the left.	 A petri dish with a blue agar surface. A large, textured, circular spot is visible in the center, indicated by a black arrow pointing to it from the right.
S10 (45°C)	 A petri dish with a light-colored agar surface. A small, dark, circular spot is visible in the center, indicated by a black arrow pointing to it from the left.	 A petri dish with a dark agar surface. A bright, circular spot is visible in the center.	 A petri dish with a red agar surface. A small, dark, circular spot is visible in the center, indicated by a black arrow pointing to it from the left.	 A petri dish with a blue agar surface. A large, textured, circular spot is visible in the center, indicated by a black arrow pointing to it from the left.
S11 (45°C)	 A petri dish with a light-colored agar surface. A small, dark, circular spot is visible in the center, indicated by a black arrow pointing to it from the left.	 A petri dish with a dark agar surface. A bright, circular spot is visible in the center.	 A petri dish with a red agar surface. A small, dark, circular spot is visible in the center, indicated by a black arrow pointing to it from the left.	 A petri dish with a blue agar surface. A large, textured, circular spot is visible in the center, indicated by a black arrow pointing to it from the left.
S12 (30°C)	 A petri dish with a light-colored agar surface. A small, dark, circular spot is visible in the center, indicated by a black arrow pointing to it from the left. There are also some faint, wavy lines on the agar surface.	 A petri dish with a dark agar surface. A bright, circular spot is visible in the center.	 A petri dish with a red agar surface. A small, dark, circular spot is visible in the center, indicated by a black arrow pointing to it from the left.	 A petri dish with a blue agar surface. A large, textured, circular spot is visible in the center, indicated by a black arrow pointing to it from the left. There are also some faint, wavy lines on the agar surface.

Les résultats obtenus après l'ensemencement des milieux gélosés et après incubation à 30°C et à 45°C pendant 5 jours, donnent des zones d'hydrolyse de diamètres différents suivant la capacité de chaque souche à dégrader le substrat disponible (**Tableau 11**) et (**Figure 6**).

Tableau 11: Diamètre (mm) de zones d'hydrolyse de souches fongiques testées après 5 jours incubation.

Souches	Diamètre (mm) des zones d'hydrolyse				Température d'incubation
	Protéase	Amylase	Cellulase	Pectinase	
S1 (M)	4	/	/	/	30°C
S2 (M)	4	/	/	/	
S3 (M)	6	/	/	/	
S4 (M)	5	20	12	12	
S5 (M)	6	7	11,5	1	
S6 (M)	/	8	/	1	
S7 (M)	5	2	8	3	
S8 (M)	*	/	/	1	
S9 (M)	6	/	/	3	
S10 (M)	3	2	2	2	
S11 (M)	3,2	2,2	2	3	
S12 (L)	/	/	/	1	30°C

/ : Absence de la zone d'hydrolyse. * : Envahissement. M : Moisissure. L : Levure.

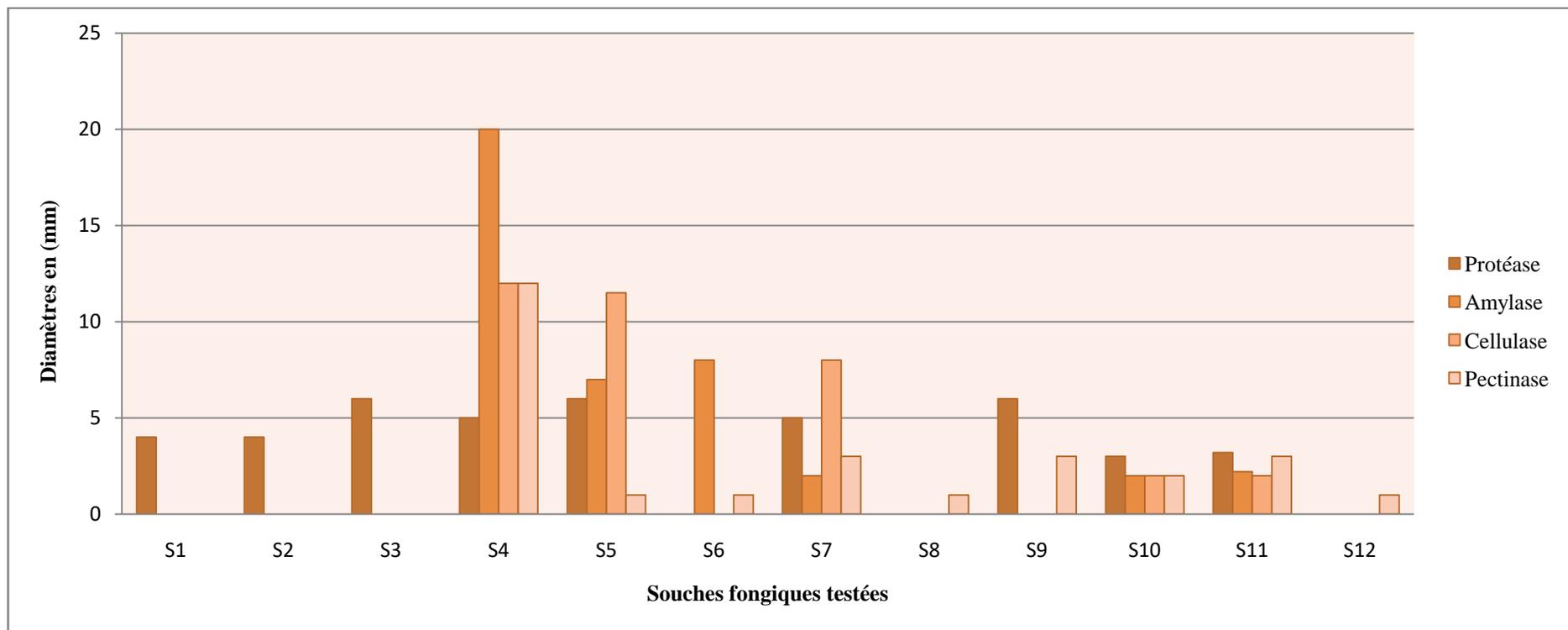


Figure 6 : Diamètre des zones de l'hydrolyse des souches fongiques testées après 5 jours incubation.

2.1.1. Activité protéolytique

Les souches protéolytiques sont reconnues par la formation d'un halo transparent autour des colonies, résultant de la dégradation des protéines du lait dans le milieu par l'exo protéase produite : plus le halo est grand, plus la quantité d'enzyme produite est importante.

D'après les résultats obtenus, la plus part des moisissures isolées sont capables de produire des protéases (à 30°C et aussi à 45°C). Sachant que, toutes les souches productrices de l'exo-protéase présentent une activité intéressante (Φ halo \geq 3mm).

Des travaux de recherche réalisés dans le but de produire des protéases à partir de moisissures ont permis de mettre en évidence la capacité d'*Aspergillus oryzae* à produire et de manière significative des protéases sur des milieux bon marché (Belmessikh, 2012 ; Benkahoul, 2017).

Il est à noter que même en absence d'une activité protéolytique exo-cellulaire, nous avons observé un envahissement du milieu, comme c'est le cas chez la souche huit (8). Ceci indique une utilisation des sucres totaux présents dans le lait comme source de carbone et d'énergie, ou par la production d'une activité protéolytique endo-cellulaire (Debananda *et al.*, 2009).

2.1.2. Activité amylolytique

D'après les résultats obtenus de l'activité amylolytique, nous avons remarqué que parmi les douze souches fongiques isolées et testées, six souches (S4, S5, S6, S7, S10 et S11) ont développé des zones d'hydrolyses (halo claire) de différents diamètres. La souche S4 a développé une zone d'hydrolyse plus importante par rapport aux autres souches avec un diamètre de 20mm. Cela indique la forte capacité de cette souche à hydrolyser l'amidon contenu dans le milieu.

Le reste des souches fongiques isolées et testées (S1, S2, S3, S8, S9 et S12) ne possèdent aucune activité amylolytique marquée sur le milieu de culture.

En effet, l'étude réalisée par Tatsinkou *et al.* (2005) a décrit la capacité de certaines souches fongiques productrice de l'alpha amylase dans les mêmes conditions expérimentales que ce travail.

2.1.3. Activité cellulolytique

D'après les résultats rapportés dans le **tableau 11** et la **figure 6**, nous avons remarqué qu'il ya cinq souches (S4, S5, S7, S10, S11) possédant une activité cellulolytique. Le reste des souches ne présentent aucune activité cellulolytique notée sur le milieu de culture.

Les diamètres obtenus chez les deux souches productrices (S4 et S5) sont très proches ($\Phi = 12\text{mm}$; $\Phi = 11,5\text{mm}$), la souche (S7) a donné une zone d'hydrolyse avec un diamètre égal à 8mm et enfin les deux souches (S10 et S11) ($\Phi = 2\text{mm}$).

Plusieurs travaux menés sur des souches fongiques isolées des milieux extrêmes montrent la capacité de ces moisissures notamment le genre *Trichoderma* à produire la cellulase (Leghlimi, 2013 ; Fergani et Lakhel, 2015)

2.1.4. Activité pectinolytique

D'après nos résultats, on a remarqué que parmi les douze souches fongiques isolées et testées, neuf souches possèdent une activité pectinolytique. En effet, une bonne activité enzymatique sur le milieu pectine-agar a été observée par l'apparition de zones claires autour des colonies.

Les zones claires ou les zones d'hydrolyse observées donnent des diamètres différents chez les neuf souches, la souche S4 présente une activité pectinolytique importante par rapport aux autres souches avec un diamètre de 12mm ; suivi par les souches S7, S9, et S11. En effet, ces résultats mettent en évidence la dégradation de la pectine contenue dans le milieu ; l'étude réalisée par Meziანი et Mahcen (2017) montrent également la production de cette enzyme par *Penicillium. sp* avec un diamètre mesuré à 7.6mm et *Aspergillus terreus* qui a donné un diamètre égal à 3.8mm.

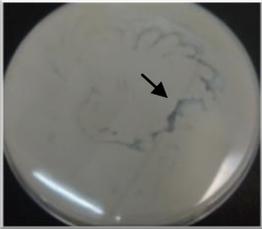
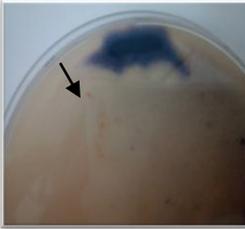
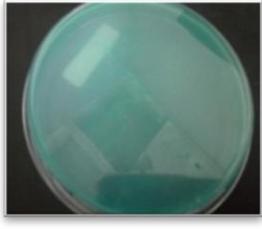
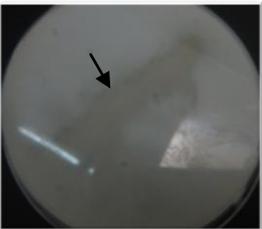
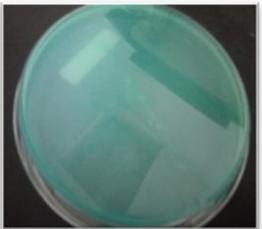
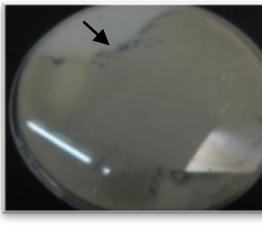
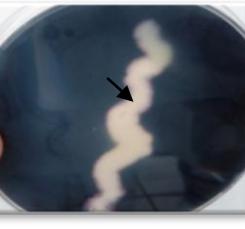
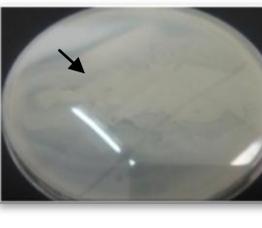
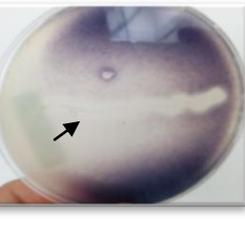
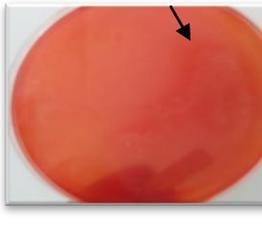
Alors, les résultats illustrés aussi bien dans le **tableau 11** et la **figure 6** montrent clairement la capacité de chaque souche isolées et testées à hydrolyser ou à dégrader les différents substrats inducteurs utilisés à savoir : la caséine du lait écrémé, l'amidon, le CMC et la pectine. En effet, cinq souches (S4, S5, S7, S10 et S11) possèdent les quatre activités enzymatique recherchées (protéolytique, amylolytique, cellulolytique et pectinolytique), trois souches (S1, S2 et S3) possèdent l'activité protéolytique, deux souches (S8 et S12) présentent qu'une seule activité enzymatique (pectinolytique), la souche (S6) possède deux activités enzymatiques (amylolytique et pectinolytique) et la souche (S9) présente deux activités enzymatiques (protéolytique et pectinolytique).

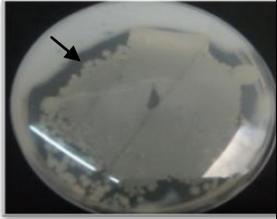
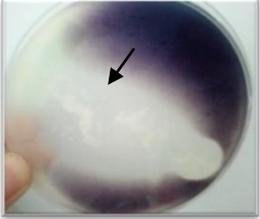
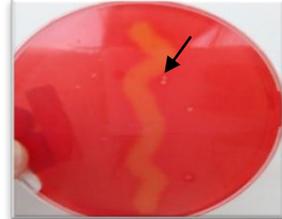
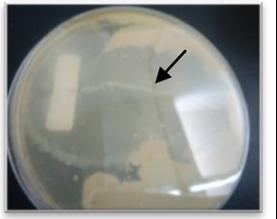
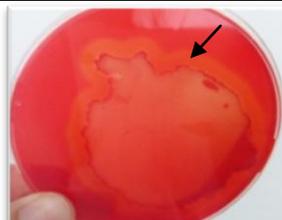
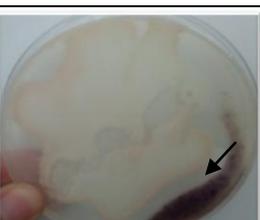
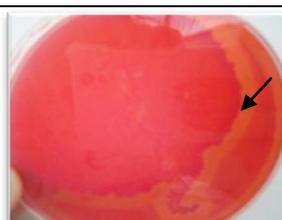
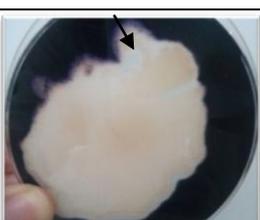
Ces résultats permettent la sélection des douze souches fongiques isolées et testées comme étant des souches productrices de (ou des) enzyme (s) (protéase, amylase, cellulase et pectinase).

2.2. Bactéries

Les activités protéolytiques, amylolytiques, cellulolytiques et pectinolytiques ont été mises en évidence en utilisant les milieux suivants: gélose au lait, GN à amidon 1%, milieu gélosé à 0,5% de CMC, milieu Pectine-agar, après incubation à 45°C pendant 48h. Les résultats sont regroupés dans les **tableaux 12 et 13**.

Tableau 12 : Zones d'hydrolyses des souches bactériennes testées après 24 h d'incubation.

Souches	Protéase	Amylase	Cellulase	Péctinase
SA1				
SS1				
SB1				
SS2				

SC1				
SB2				
SA2				
SC2				
SS3				
SA3				

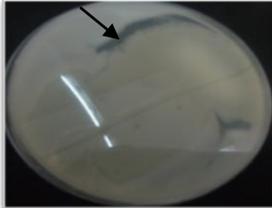
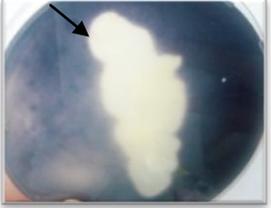
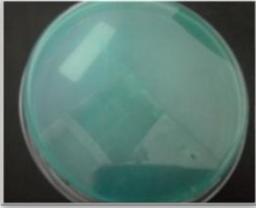
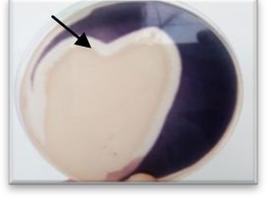
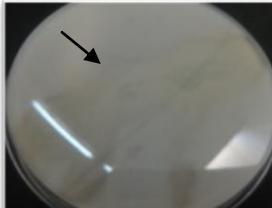
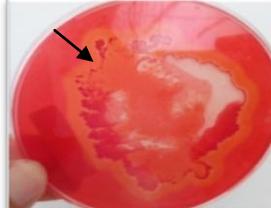
SB3				
SA4				
SA5				

Tableau 13 : Activités hydrolytiques des souches bactériennes après 48h d'incubation.

Souches	Protéase	Amylase	Cellulase	Péctinase
SA1	+	+	+	-
SS1	+	+	+	-
SB1	+	+	-	-
SS2	+	+	+	-
SC1	+	+	+	-
SB2	+	-	+	-
SA2	+	+	+	-
SC2	+	+	+	-
SS3	+	+	+	-
SA3	+	+	-	-
SB3	+	+	+	-
SA4	-	+	-	-
SA5	+	+	+	-

Un screening des activités protéolytiques, amylolytiques, cellulolytiques et pectinolytique a été effectué. La présence de ces activités est détectée en utilisant les substrats, lait écrémé, amidon, carboxyméthylcellulose (CMC) et pectine respectivement. Les résultats présentés dans les **tableaux 12 et 13** sont obtenus après plusieurs essais. Toutes les souches étudiées possèdent au moins une activité hydrolytique.

2.2.1. Activité protéolytique

Les **tableaux 12 et 13** montrent que toutes les souches possèdent la protéase. Cette enzyme est mise en évidence par la formation d'un halo clair autour des colonies.

Les membres thermophiles tel que les *Bacillaceae* fournissent d'importantes protéases thermostables à l'industrie, cas de la thermolysine, une métalloprotéase produite par

Geobacillus stearothermophilus avec une demi-vie d'une heure à 80°C (Rao *et al.*, 1998 ; Haaki et Rakshit, 2003).

2.2.2. Activité amylolytique

La plupart des souches sont capables d'hydrolyser l'amidon, ce qui signifie que ces dernières possèdent une amylase. L'hydrolyse de l'amidon s'exprime par un halo d'éclaircissement autour des colonies (Tableau 12) et (Tableau 13). Selon Satyanarayana et Johri (2005), de nombreuses espèces du genre *Bacillus* sont connues par leur capacité à produire des α -amylases thermostables. Celles-ci comprennent des α -amylases de *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *Geobacillus thermoleovorans*, *B. stearothermophilus*, et *B. thermoamyloliquefaciens*.

2.2.3. Activité cellulolytique

D'après les résultats des cultures mentionnées dans le tableau 12 et 13 le carboxyméthylcellulose (CMC) est hydrolysé par 10 souches bactériennes.

2.2.4. Activité Pectinolytique

Aucune souche n'est capable d'hydrolyser la pectine, cela se traduit par l'absence d'un halo clair autour des colonies. De ce fait toutes les souches bactériennes étudiées sont dépourvues de la pectinase exo-cellulaire.

Les bactéries thermophiles ont développé une variété de stratégies moléculaires pour survivre aux conditions environnementales extrêmes. Pour l'utilisation des substrats naturels, un nombre de bactéries thermophiles, produisent une gamme d'enzymes hydrolytiques (protéase, cellulase, amylase, glucosidase, glucoamylase, pullulanases, cyclodextrine glycosyl transferase). Elles sont également capables de dégrader d'autres polysaccharides, tels que le glycogène, fourni par des cellules animales ou microbiennes (Bertoldo et Antranikian, 2001), les composés polyphénoliques, les n-alcanes, et même certains polymères synthétiques comme le plastique (Pinzón- Martínez *et al.*, 2010).

Le bagage enzymatique des microorganismes est directement influencé par la disponibilité des nutriments dans l'environnement et fait partie de l'adaptation de ces microorganismes à leur milieu naturel. Autre point important, il semble qu'une plus grande adaptabilité de certaines souches aux conditions de température, de pH et de salinité a une relation avec la capacité de ces mêmes souches à produire des enzymes extracellulaires : une

plus grande capacité d'adaptation implique des mécanismes métaboliques plus développés comparativement à des organismes qui en sont dépourvus (**Cohen, 2011**). Ces derniers seront confrontés à un milieu moins favorable, lorsqu'ils sont exposés aux mêmes conditions environnementales.

En somme, des membres des genres thermophiles notamment les Bacillales sont connus pour leur capacité à produire des enzymes d'hydrolyse (**Burgess *et al.*, 2010**).

3. Identification des micro-organismes sélectionnés

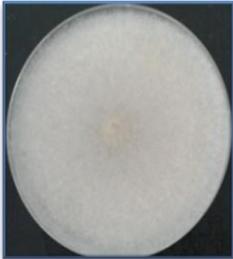
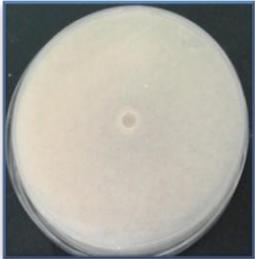
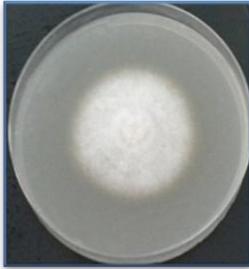
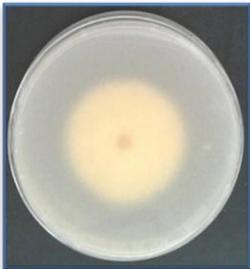
3.1. Identification des moisissures

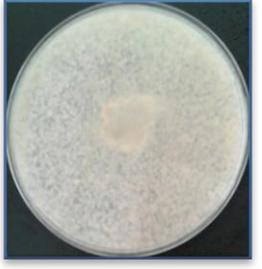
L'identification des moisissures a été réalisée par un examen macroscopique et microscopique.

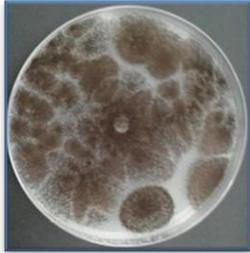
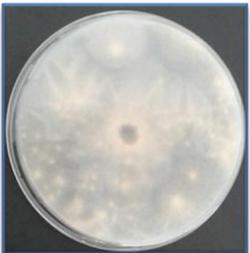
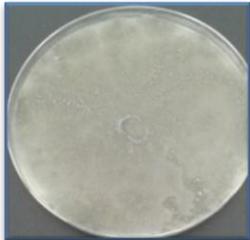
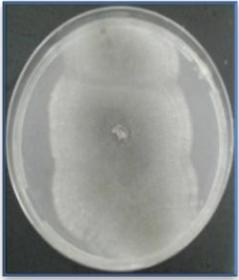
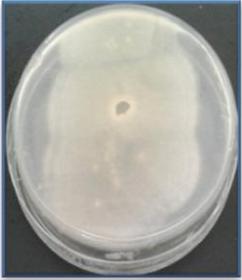
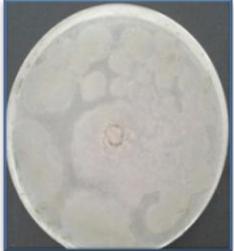
3.1.1. Identification macroscopique

Les caractères macroscopiques des différentes souches de moisissures isolées et sélectionnées sont étudiés sur milieu gélosé PDA, l'un des milieux les plus fréquemment utilisés. Le **tableau 14** regroupe les photos de l'aspect macroscopique des mycéliums, la vitesse de croissance, la texture, la couleur du mycélium et la couleur du revers des boîtes de Pétri.

Tableau 14 : Observation macroscopique des moisissures sélectionnées sur milieu PDA.

Souches	Vitesse de croissance	Couleur de face	Texture	Couleur de revers	Photos obtenus	
					Face	Revers
S1 (30°C)	Croissance très rapide et extensive	Blanche au début puis brun après sporulation	Laineuse	Incolore		
S2 (30°C)	Croissance lente	Blanche avec contour blanc	Cotonneuse	Jaune		

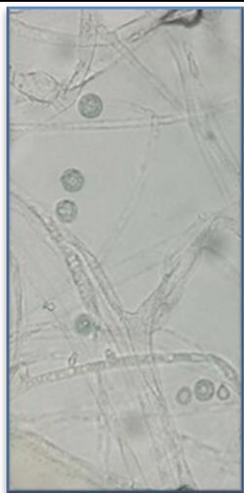
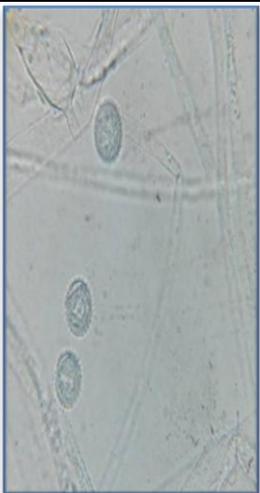
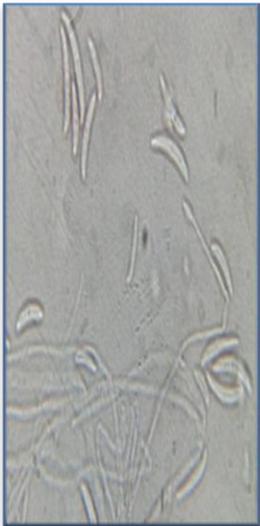
S3 (30°C)	Croissance rapide	Blanche	Filamenteuse	Incolore		
S4 (30°C)	Croissance lente	Vert avec contour blanc	Veloutée à poudreuse	Jaune		
S5 (30°C)	Croissance moyenne	Vert	Veloutée à envahissante	Incolore		
S6 (30°C)	Croissance moyenne	Brun verdâtre avec contour blanc	Veloutée à Poudreuse	Jaune foncé		

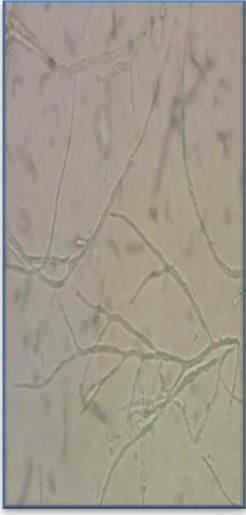
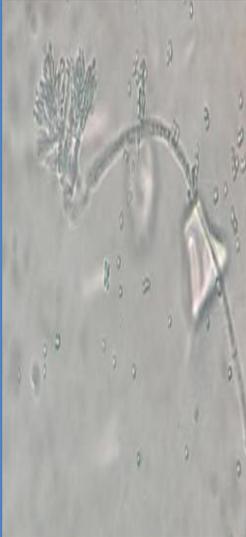
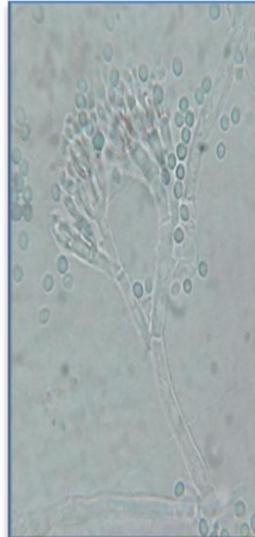
S7 (30°C)	Croissance rapide	Blanche au début, puis jaune et à maturité, elles deviennent noires.	Granuleuse à envahissante	Incolore		
S8 (30°C)	Croissance très rapide	Blanche au début puis vert-foncé	Poudreuse à envahissante	Incolore		
S9 (30°C)	Croissance très rapide	Vert avec contour blanc	Poudreuse	Incolore		
S10 (45°C)	Croissance très rapide	Blanche au début puis vert- foncé	Poudreuse	Incolore		
S11 (45°C)	Croissance très rapide	Blanche au début puis vert- foncé	Poudreuse	Incolore		

3.1.2. Identification microscopique

L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques des onze souches des moisissures sélectionnées (Conidiophores, conidies, mycélium etc.) (**Tableau 15**). En renforçant les observations macroscopiques par l'étude microscopique, les résultats ont permis de noter cinq genres de moisissures.

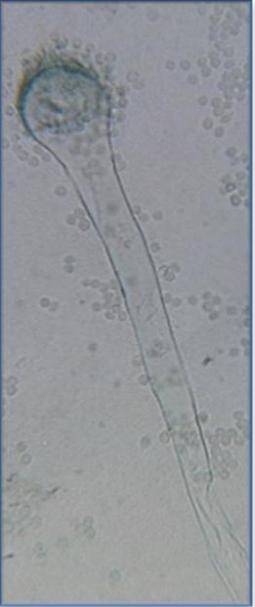
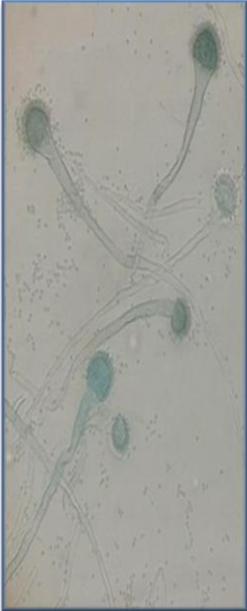
Tableau 15 : Etude microscopique des moisissures sélectionnées.

Souches	Description	Genre	Photos obtenus	
			Grossissement X40	Grossissement X100
S1 (30°C)	<ul style="list-style-type: none"> - Filament large non septé - Pas de stolons ni rhizoïdes. - Sporocystophore portant un sporocyste globuleux dépourvu d'apophyse. - Spore rondes. 	<i>Mucor sp.</i>		
S2 (30°C)	<ul style="list-style-type: none"> - Hyphes septée fin. - Conidiophore simple ou verticillés, courts. - Macroconidies fusiformes, pluriseptées. - Pas de clamydospores. 	<i>Fusarium sp.</i>		

<p>S3 (30°C)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Mycélium cloisonné. - Présence des angles (90°). - Absence des spores. 	<p><i>Rhizoctonia sp.</i></p>		
<p>S4 (30°C)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Hyphe septé. - Conidiophore isolés. - Pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore. - Phialides en forme de verticilles. - Présence de métules. 	<p><i>Penicillium sp.1</i></p>		
<p>S5 (30°C)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Hyphe septé. - Conidiophore isolés. - Pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore. - Phialides en forme de verticilles. - Présence de métules. 	<p><i>Penicillium sp.2</i></p>		

<p>S6 (30°C)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Hyphe septé. - Conidiophore isolés. - Pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore. - Phialides en forme de verticilles. - Présence de métules. 	<p><i>Penicillium sp.3</i></p>		
<p>S7 (30°C)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiophore lisse, très long. - Vésicule globuleuse - Phialides insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées surtout le pourteur de la vésicule. - Conidies globuleuses, brun. - Tête aspergillaire bisériée radiée, noire à maturité. 	<p><i>Aspergillus niger</i></p>		

<p>S8 (30°C)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Filament septé. - Conidiophore court, lisse et incolore. - Phialides directement portées par la vésicule, dressées, densément groupées. - Conidies globulose, vertes, échinullées, petites. - Tête aspergillaire unisériée en colonne compacte, assez grande. 	<p><i>Aspergillus sp.2</i></p>		
<p>S9 (30°C)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Filament septé. - Conidiophore court, lisse et incolore. - Phialides directement portées par la vésicule, dressées, densément groupées. - Conidies globulose, vertes, échinullées, petites. - Tête aspergillaire unisériée en colonne compacte, assez grande. 	<p><i>Aspergillus sp.3</i></p>		

<p>S10 (45°C)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Filament septé. - Conidiophore court, lisse et incolore. - Phialides directement portées par la vésicule, dressées, densément groupées. - Conidies globuleuses, vertes, échinulées, petites. - Tête aspergillaire unisériée en colonne compacte, assez grande. 	<p><i>Aspergillus sp.4</i></p>	 	
<p>S11 (30°C)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Filament septé. - Conidiophore court, lisse et incolore. - Phialides directement portées par la vésicule, dressées, densément groupées. - Conidies de petite taille globuleuse. - Tête aspergillaire unisériée en colonne compacte, assez grande. 	<p><i>Aspergillus sp.5</i></p>		

Sur la base des résultats obtenus et en utilisant le catalogue « les moisissures d'intérêt médical et *description of medical fungi* » (Chabasse *et al.*, 2002), cinq genres de moisissure ont été identifiés, il s'agit de : *Mucor*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Penecillium* et *Aspergillus*.

- **Une souche (S1) présente les caractères suivants :**

- Filaments larges non cloisonné.
- Absence de stolons et de rhizoïdes.
- Sporocystophore portant un sporocyste globuleux dépourvu d'apophyse.
- Spore ronde.

D'après les observations réalisées et la comparaison avec la bibliographie, cette souche semble appartenir au genre : *Mucor*

- **Une souche (S2) a les caractéristiques suivantes :**

- Thalle septée fin.
- Conidiophore simple ou verticillés, courts.
- Macroconidies fusiformes, pluriseptées.
- Pas de clamydospores.

D'après ces descriptions, il apparait que la souche appartient probablement au genre : *Fusarium*

- **Une souche (S3) caractérisée par :**

- Mycélium cloisonné.
- Présence des angles (90°).
- Absence des spores.

Ces critères rejoignent ceux du genre : *Rhizoctonia*

- **Trois souches (S4, S5, S6) présentent les caractéristiques suivantes :**

- Hyphe septé. ; Conidiophore isolés.
- Pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.
- Phialides en forme de verticilles.
- Présence de métule.

Ces souches semblent appartenir au genre : *Penicillium*

- **Une souche (S7) présente les caractères suivants :**

- Conidiophore très long
- Vésicule globuleuse
- Phialides insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées surtout le pourtour de la vésicule.
- Conidies globuleuses, brun
- Tête aspergillaire bisériée radiée, noire à maturité.

Cette souche semble appartenir au genre *Aspergillus* notamment l'espèce « *A. niger* »

- **Quatre souches (S8, S9, S10, S11) décrites par les caractéristiques suivantes :**

- Filament septé
- Conidiophore court, lisse et incolore.
- Phialides directement portées par la vésicule, dressée, densément groupées.
- Conidies de petite taille globuleuse.
- Tête aspergillaire unisériée en colonne compacte, assez grande.

Ces souches semblent appartenir au genre : *Aspergillus*

Ces résultats montrent l'existence d'une flore fongique plus ou moins variée qui possède une ou plusieurs activités enzymatiques ; on a identifié cinq genres, il s'agit de : *Mucor*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Penicillium* et *Aspergillus* avec une dominance du genre *Aspergillus* qui représente 46% du total des souches isolées, suivi de *Penicillium* avec 27% et enfin *Mucor*, *Fusarium* et *Rhizoctonia* avec seulement 9% (**Figure 7**).

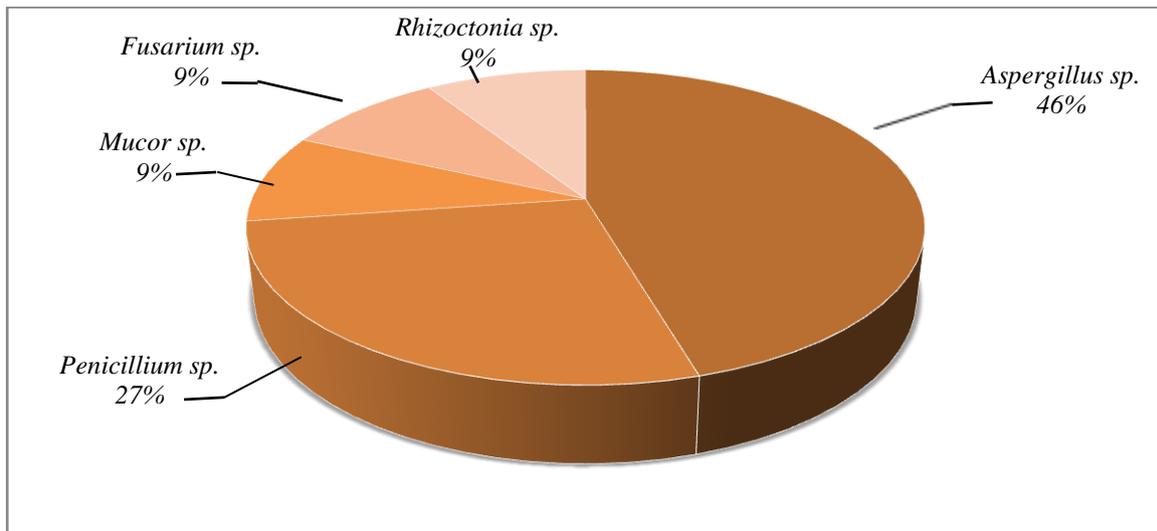
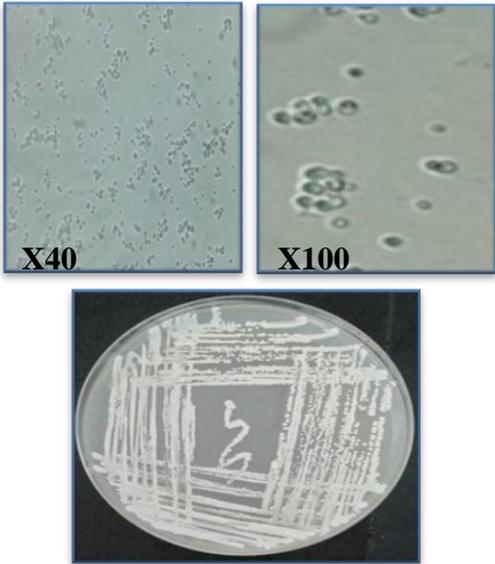


Figure 7 : Pourcentage des genres de moisissures isolés, sélectionnés et identifiés.

3.2. Identification de la levure sélectionnée (S12)

Les résultats des caractéristiques macroscopiques et microscopiques sont récapitulés dans le **tableau 16**.

Tableau 16 : Caractéristiques macroscopique et microscopique de la levure sélectionnée cultivées sur milieu PDA et incubées à 30°C pendant 48-72h.

Souche	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Photos obtenus
S12 (L) (30°C)	Colonies rondes, Blanche, crémeuse, lisses, bombées d'aspect brillant	Cellules sphérique ou subsphérique, immobiles, séparées ou en amas, production végétative par bougeonnement. pas de pseudomycélium.	 <p>The 'Photos obtenus' column contains three images: a microscopic view at X40 magnification showing numerous small, round cells; a microscopic view at X100 magnification showing larger, more distinct spherical cells, some appearing to be budding; and a macroscopic photograph of a petri dish containing a white, circular, and slightly raised yeast colony.</p>

- **L'étude des caractères cultureux de la levure sélectionnée a pu ressortir les caractères suivants :**
 - Colonies sphériques, blanche, crémeuse, lisse, bombées, brillant.
- **L'étude des caractères morphologique a donné les caractères suivants :**
 - La forme des cellules est arrondie.
 - La division cellulaire se fait par bourgeonnement unipolaire.
 - Absence de pseudomycélium.

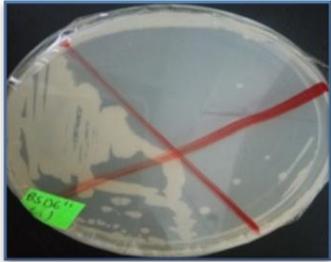
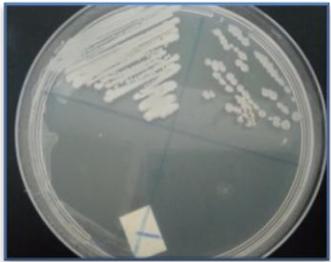
3.3. Identification des bactéries sélectionnées

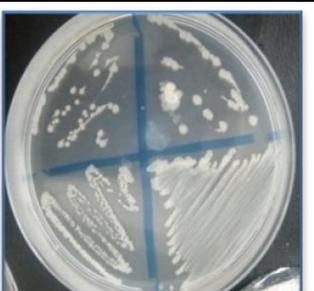
L'identification des souches isolées a porté sur l'étude des caractères morphologiques et biochimiques.

3.3.1. Etude macroscopique

Tous les isolats bactériens obtenus ont des aspects différents capables de pousser à 45°C pendant 24 à 48 h sur GN. L'observation macroscopique de ces isolats a permis de déterminer de nombreux critères : forme, couleur, taille et contour. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 17** ci-dessous.

Tableau 17 : Critères macroscopiques des isolats bactériens isolés sur milieu GN.

Souche	Forme	Taille	Aspect	Couleur	Contour	Image
SD1	Ronde	Petite	Crémeux	Crème	Régulier	
SS1	Ronde	Petite	Rugueux	Crème	Régulier	
SB1	Ronde	Moyenne	Crémeux	crème	Régulier	

SS2	Ronde	Moyenne	Crémeux	Crème	Régulier	
SC1	Ronde	Moyenne	Crémeux	Beige	Régulier	
SB2	Ronde	Petite	Rugueux	crème	Régulier	
SA1	Ronde	Petite	Crémeux	Beige	Régulier	
SC2	Ronde	Petite	Crémeux	Beige	Régulier	
SS3	Ronde	Petite	Rugueux	Beige	Irrégulier	

SA2	Ronde	Petite	Rugueux	Blanche	Irrégulier	
SB3	Ronde	Moyenne	Crémeux	Crème	Régulier	
SA3	Ronde	Moyenne	Rugueux	Beige	Régulier	
SA4	Ronde	Petite	Rugueux	Blanche	Régulier	

L'observation macroscopique des souches sur GN a permis de dégager deux aspects différents de colonies, crémeux et rugueux. Parmi les treize souches, six ont un aspect rugueux et sept ont un aspect crémeux.

Sur l'ensemble des phénons, les souches ont présentés une croissance optimale à la température d'incubation utilisée, celle de 45°C et selon (**borck, 1978 ; Perry etstaley, 1997 ; Souzaet Martins, 2001**) elles sont classées parmi les thermophiles. Le terme de « thermophile température-tolérant » a été inventé par **Wiegel (1990)**, pour désigner ce type de microorganismes.

Il est important de signaler que nos isolats sont incapables de se développer à 55°C malgré que quelques membres proviennent de sites ayant des températures beaucoup plus élevées que cette température. Il est probable que ces isolats ne peuvent pas se trouver en état actif en sachant que la température est un facteur important conditionnant leur prolifération.

Le même raisonnement peut expliquer l'isolement de certains organismes à des températures beaucoup plus basses que leur minimum de croissance (Niehaus *et al.*, 1999). Selon Weigel (1986), il est également possible d'isoler des microorganismes thermophiles à partir de la glace arctique.

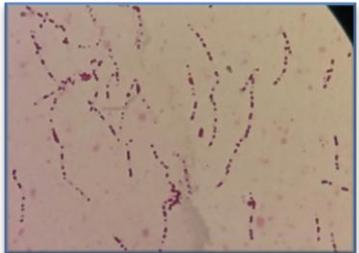
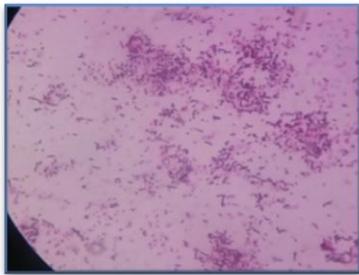
Ainsi différents types phénotypiques ont été retrouvés aussi bien dans les échantillons de la source d'eau thermale que dans le sol. C'est ce qui nous laisse supposer que la température n'est pas l'unique facteur qui joue sur la diversité des organismes présents dans ce type d'environnement, d'autres facteurs comme la composition minérale et organique, la localisation géographique des sites géothermaux peuvent également entrer en jeu.

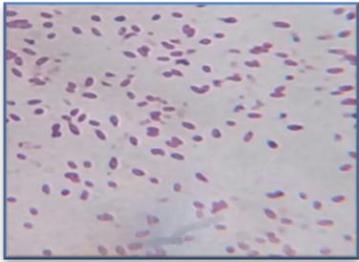
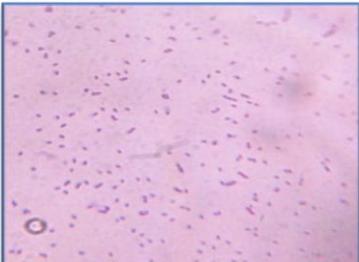
3.3.2. Etude microscopique

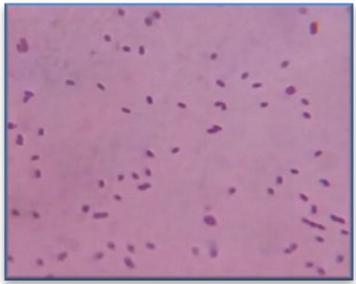
L'observation à l'état frais et la coloration de Gram ont permis de donner une idée sur la morphologie des cellules bactériennes, leur mobilité et la composition de leur paroi. Les résultats dans le **tableau 18** résument les caractéristiques de l'ensemble des isolats bactériens.

Tableau 18 : Critères microscopiques des isolats bactériens isolés sur milieu GN.

Souche	Coloration de GRAM		Etat frais		
	+ / -	Image	Mode de regroupement	Mobilité	Forme
SD1	-		Longue chaine	Mobile	Coque
SS1	+		Isolé	Mobile	Longs Bacilles

SB1	+		Isolé	Immobile	Gros bacilles
SS2	+		Longue chaine	Immobile	Coque
SC1	+		Longue chaine	Immobile	Coccobacille
SB2	+		Isolé	Mobile	Petits bâtonnets
SA1	+		Isolé	Immobile	Petits bâtonnets

SC2	+		Isolé	Immobile	Coccobacilles
SS3	+		Isolé	Immobile	Bacilles
SA2	+		Isolé et longue chaîne	Mobile	Coque
SB3	-		Isolé et longue chaîne	immobile	Très longs bacilles
SA3	+		Longue chaîne	Immobile	Bacilles

SA4	-		Isolé	Immobile	Coque
-----	---	---	-------	----------	-------

- **Coloration de Gram**

La coloration de Gram, effectuée sur des cultures jeunes sur milieu GN a révélé que dix souches sont à Gram positif et trois à Gram négatif. Les formes cellulaires observées sous microscope photonique sont : des bâtonnets parfois enflés à l'extrémité isolés ou arrangés en longues chaînes selon les isolats, des coque et aussi des coccobacilles.

- **Observation à l'état frais**

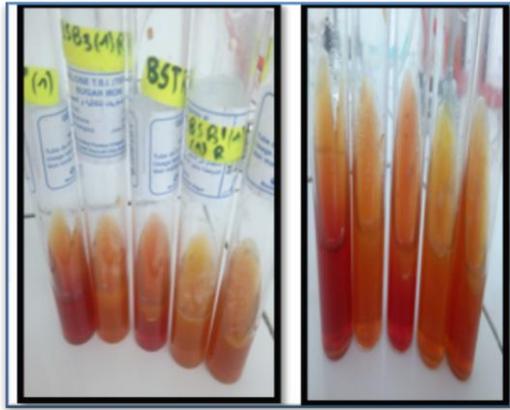
L'observation des bactéries à l'état frais montre que certains isolats sont très mobiles (SD1 ; SS1, SB2, SA2), tandis que la plus part sont lentes et immobiles et présentent un mouvement Brawnien (SB1, SS2, SC1, SA1, SC2, SS3, SB3, SA3, SA4).

Les formes cellulaires observées en microscopie photonique sont :des bâtonnets parfois enflés à l'extrémité isolés ou arrangés en longues chaînes selon les isolats(SS1, SB1, SB2, SA1, SS3, SA3).L'aspect coccobacille est rencontré uniquement chez deux souches (SC1 et SC2) alors que la forme coccoïde avec un mode de formation en longue chaine est observée chez quatre souches (SD1, SA2, SA4, SS2).

La plupart des souches sont des bacilles (SD1, SB1, SB2, SB3, SA1, SS3, SA3). L'aspect coccobacille est rencontré uniquement chez deux souches (SC1 et SC2) alors que la forme coccoïde avec un mode de formation en longue chaine est observée chez quatre souches (SD1, SA2, SA4, SS2).

3.3.3. Tests biochimiques

Les résultats de la caractérisation biochimique des isolats bactériens sont représentés dans le **tableau 19** et la **figure 8**.



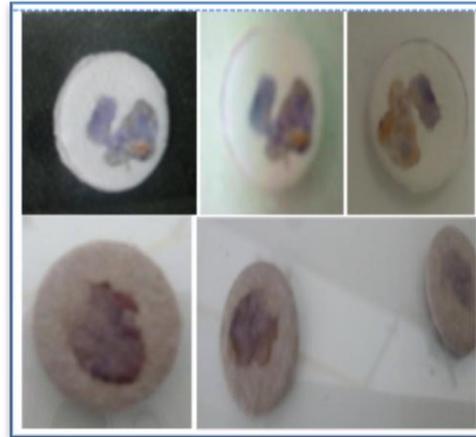
A- Le test TSI pour les différents isolats



B-Type respiratoire pour les différents isolats



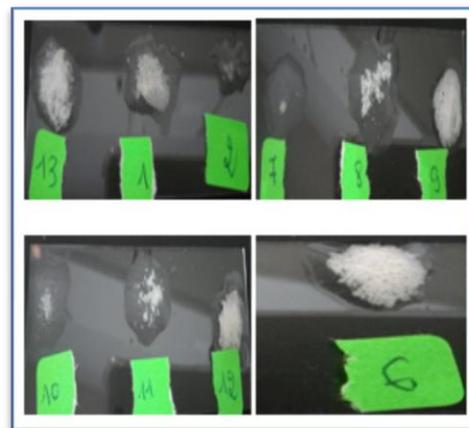
C- Mise en évidence de la réduction du nitrate en nitrite par la nitrate-réductase.



D- Test oxydase pour les isolats sélectionnés



E- L'utilisation du mannitol par les différents isolats sur milieu mannitol-mobilité



F- L'effervescence obtenue de la réaction d' H_2O_2

Figure 8 : Tests biochimiques pour les différents isolats.

Tableau 19 : caractérisations biochimiques des différents isolats bactériens.

Souches	catalase	oxydase	Type respiratoire	Mannitol-mobilité		Nitrate réductase	TSI	H2S
				Mobilité	Dégradation du mannitol			
SD1	+	+	AAF	+	Partielle	+	+	+
SS1	+	+	AAF	+	Partielle	+	+	+
SB1	+	+	AAF	-	partielle	+	+	+
SS2	-	+	AAF	-	Complète	+	+	+
SC1	+	+	AAF	-	Partielle	+	+	+
SB2	+	+	AAF	+	Partielle	+	+	+
SA1	-	+	AAF	-	Partielle	+	+	+
SC2	+	+	AAF	-	Partielle	+	+	+
SS3	+	+	AAF	-	Partielle	+	+	+
SA2	-	+	AAF	+	Partielle	+	+	+
SB3	+	+	AAF	-	Partielle	+	+	+
SA3	+	+	AAF	-	Partielle	+	+	+
SA4	+	+	AAF	-	Partielle	+	+	+

+ : Positif - : Négatif AAF : Aéro-Anaérobie-Facultatif

- **Métabolisme respiratoire**

Le type respiratoire des bactéries est déterminé par la culture sur milieu Viande-Foie. Tous les isolats peuvent croître tout au long du milieu, il s'agit de bactéries aérobies-anaérobies facultatives.

Le **tableau 19** montre que toutes les souches bactériennes étudiées possèdent au moins l'une des deux enzymes respiratoires recherchées (oxydase et catalase). Toutes les souches sont oxydase positive alors que dix souches uniquement sont catalase positive (SD1, SS1,

SB1, SC1, SB2, SC2, SS3, SB3, SA3, SA4) car chacune d'elles présente des bulles après le dépôt du peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Cette enzyme contient du fer qui catalyse la décomposition de ce dernier. c'est le cas de la plupart des isolats bactériens aérobies et anaérobies facultatives thermophiles (**Dinsdale et al., 2001 ; Nazina et al., 2001**).

- **Utilisation des sucres sur milieu Triple SugarIron**

Le milieu Triple Sugar Iron (TSI) renseigne sur la capacité à dégrader le glucose, le lactose et/ou le saccharose. L'oxydation est observée chez toutes les souches et elle est accompagnée d'une production de CO₂.

- **Mannitol mobilité**

La fermentation du mannitol a été observée chez une souche. Un virage faible de l'indicateur au jaune a également été noté. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'acidification produite par les bactéries aéro-anaérobies facultatives est en général insuffisante face à l'importance du pouvoir tampon du milieu (**Joffin et Leyral, 2006**).

La plupart des souches sont immobiles (SB1, SS2, SC1, SA1, SC2, SS3, SB3, SA3, SA4). En effet, quatre souches seulement (SD1, SS1, SB2, SA2) ont donné un résultat positif sur le milieu mannitol-mobilité.

- **Nitrate réductase**

La réduction du nitrate en nitrite est observée chez toutes les souches bactériennes étudiées ce qui indique qu'elles possèdent l'enzyme Nitrate Réductase.

3.3.4. Test de thermo-résistance

Le traitement thermique des souches bactériennes présentées sous forme de bacilles est effectué par par ensemencement d'une suspension bactérienne chauffée à 80°C pendant 12min, sur Gélose nutritive à 45°C durant 24h a permis d'obtenir des colonies résistantes par développement des spores qui représentent une forme particulière de résistance chez le groupe de *Bacillus* (**Dellarras, 2007**). Cette sporulation est un phénomène naturel dans le cycle de croissance de ce groupe (**Ponce et al., 2008**). Il intervient lorsque les conditions deviennent défavorables à la croissance (carence en nutriments, en sels minéraux, manque d'eau), c'est-à-dire lorsque l'organisme est en situation de stress (**Barill et al., 2012**).

Les facteurs environnementaux des milieux extrêmes, tels que la température, le pH, le degré de salinité et l'activité de l'eau, influencent fortement la survie des microorganismes et conduisent à une réduction de leur diversité d'une part, et développe chez d'autres, une résistance par production de substances particulières d'autre part (Bar *et al.*, 2002 ; Rocha *et al.*, 2002).

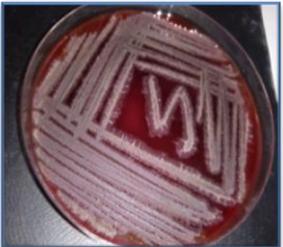
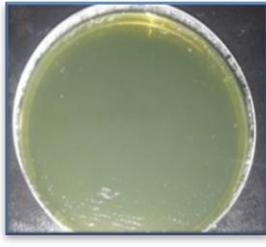
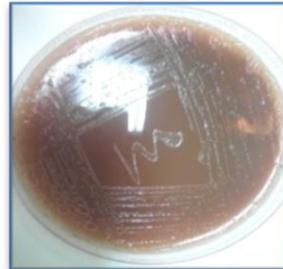
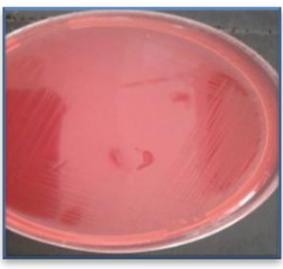
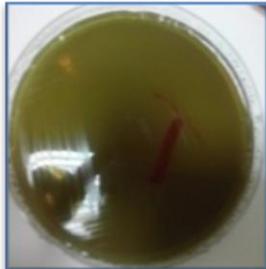
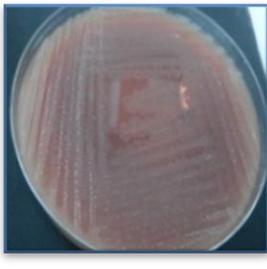
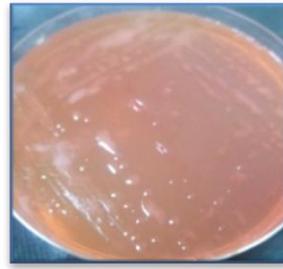
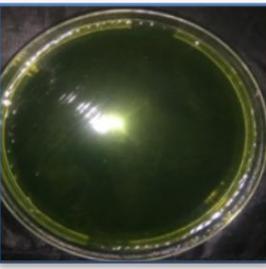
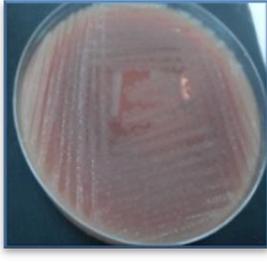
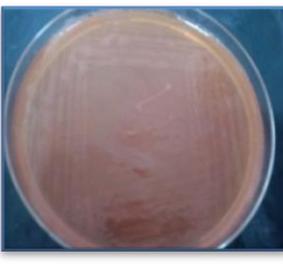
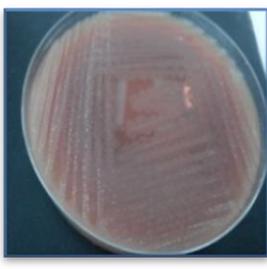
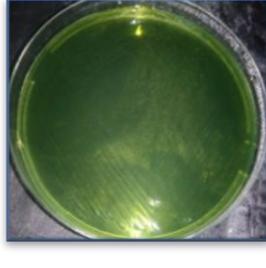
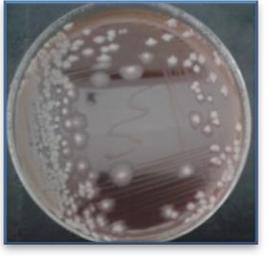
3.3.5. Culture sur milieux sélectifs

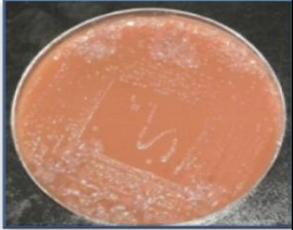
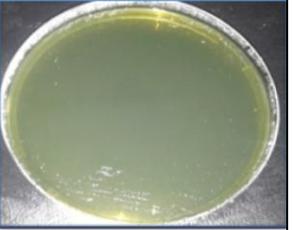
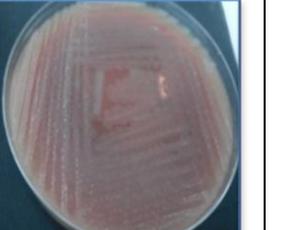
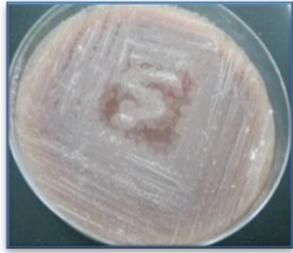
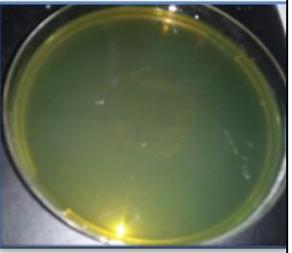
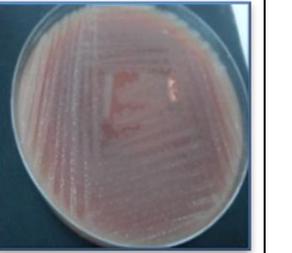
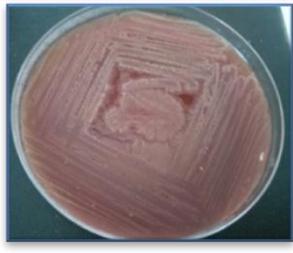
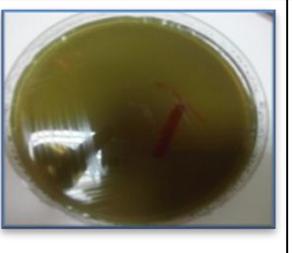
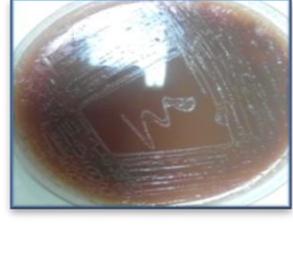
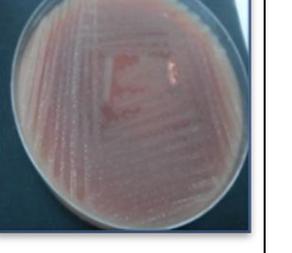
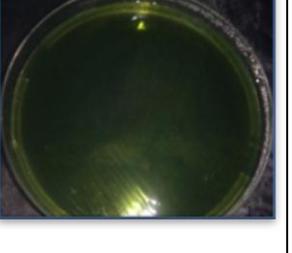
La culture sur les milieux : Chocolat, Chapman, Hektoen et Gélose au sang frais nous a permis d'obtenir les résultats représentés dans le **tableau 20** et le **tableau 21**.

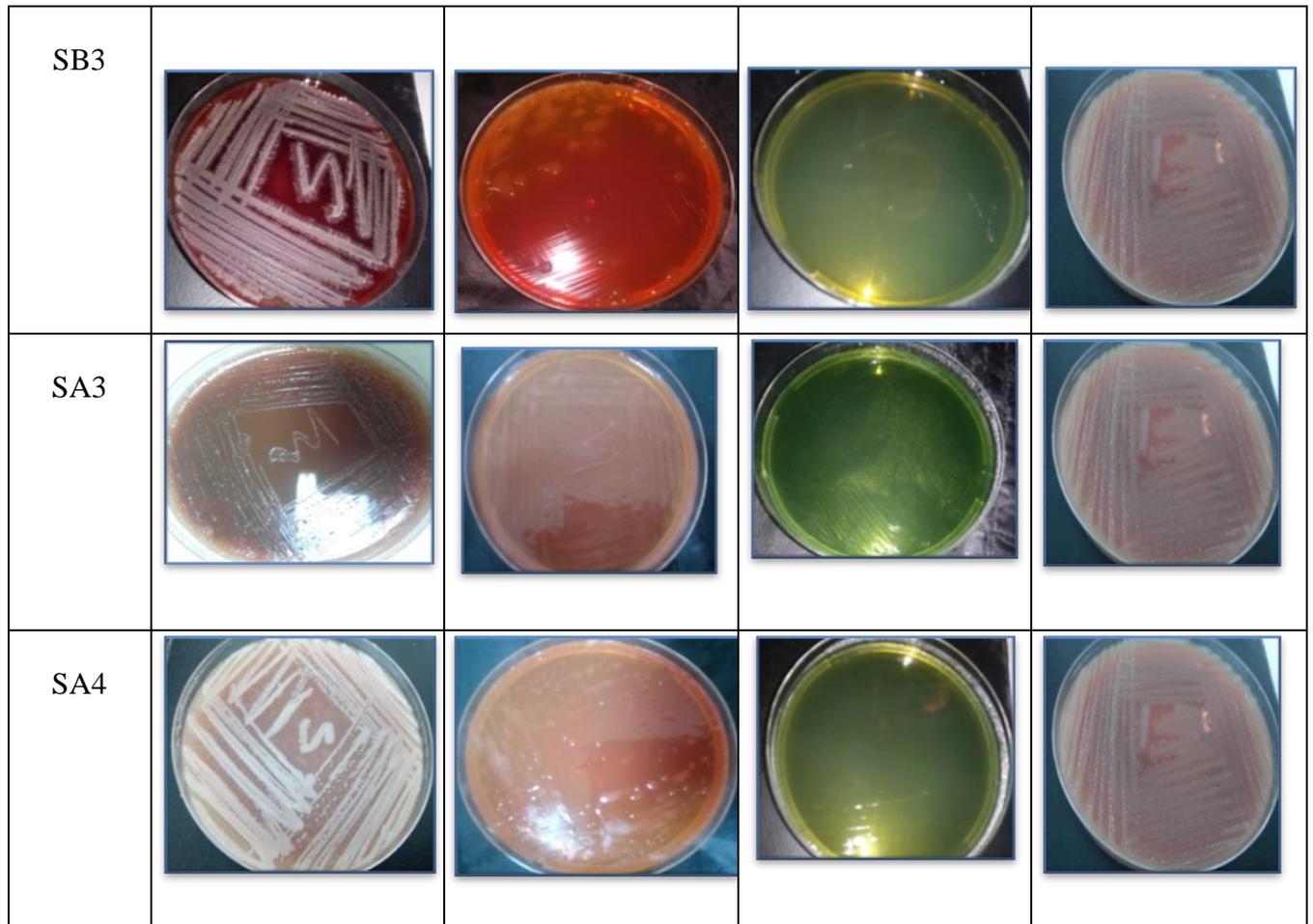
Tableau 20 : Souches bactériennes sélectionnées sur différents milieux de culture.

Souches	Chocolat	Chapman	Hektoen	Gélose à sang frais
SD1	+	+	-	+
SS1	+	-	-	+
SB1	+	+	-	+
SS2	+	+	-	+
SC1	+	+	-	+
SB2	+	+	-	+
SA1	+	+	-	+
SC2	+	+	-	+
SS3	+	+	-	+
SA2	+	+	-	-
SB3	+	+	-	+
SA3	+	+	-	+
SA4	+	+	-	+

Tableau 21 : Souches bactériennes étudiées sur certains milieux sélectifs.

Souches	Chocolat	Chapman	Hektoen	Gélose à sang frais
SD1				
SS1				
SB1				
SS2				
SC1				

SB2				
SA1				
SC2				
SS3				
SA2				Aucun développement



- **Milieu Chapman**

Sur le milieu de Chapman, toutes les souches ont poussés mais elles ne représentent aucune caractérisation du genre *Staphylococcus*. Le développement bactérien sur ce milieu ne constitue qu'une indication, d'autres bactéries peuvent y cultiver. Sur ce milieu, les colonies de *Staphylococcus* apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté, si non les colonies sont de couleur blanche.

- **Milieu Hektoen**

La culture sur milieu Hektoen n'as pas permis le développement des colonies ce qui explique que nos souches n'appartiennent pas aux Entérobactéries.

- **Milieu Chocolat**

Ce milieu a permis le développement de toutes les souches bactériennes car c'est un milieu d'enrichissement.

- **Milieu Gélose à sang frais**

Ce milieu a permis le développement de la majorité des souches bactériennes mais ces dernières ne représentent aucune caractéristique hémolytique donc les souches sont dépourvues de l'hémolyse alpha et bêta.

D'après les **tableaux 20** et **21**, les caractères d'identification ont permis l'orientation vers les genres *Bacillus*, *Thermobacillus* et autres genres dont les tests effectués sont insuffisants de les déterminer, avec une dominance du genre *Bacillus*.

Le genre *Bacillus* a été isolé de tous les échantillons ; sa présence due à la capacité de ce genre à se déplacer à des vitesses élevées et à leur résistance aux conditions environnementales difficiles (**Connor et al., 2010**) en plus de son adaptation aux environnements chauds (**Kawasaki et al., 2012 ; Anniz et al., 2015**). Les souches de *Bacillus* ont été dominantes dans les études menées par différents chercheurs à travers le monde. Par exemple, 97,5% des souches récupérées par **Aanniz et al. (2015)** des sources thermales marocaines appartenaient à ce genre. De plus, **Maugeri et al. (2001)** ont isolé 87 bactéries thermophiles, aérobies et sporogènes des îles Eoliennes (Italie), où les espèces dominantes retenues au genre *Bacillus*. De plus, le *Bacillus* thermophile était la souche dominante des sources thermales jordaniennes comme l'ont rapporté **Abou-Shanab (2007)** et **Malkawi et Al-Omari (2010)**.

Les thermophiles facultatifs font partie du genre *Bacillus* et ont l'aptitude à croître à des températures mésophiles et thermophiles (30-55°C), en fonction de la souche. Quelques exemples d'espèces comprennent *Bacillus coagulans*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. sporothermodurans* et *Bacillus subtilis* (**Barbarous et Gulsun, 2014**).

Conclusion

Les extrêmophiles sont des microorganismes sollicités par beaucoup d'applications dans plusieurs domaines entre autres l'agriculture, les détergents, la pétrochimie, la bio-remédiation des sols et bien d'autres. Les microorganismes thermophiles se développant de façon optimale à des températures supérieures à 50°C sont parmi ceux les mieux étudiés. Ils sont isolés à partir de différents environnements extrêmes et leurs enzymes présentent une thermo stabilité très recherchée par différentes industries à cause de leurs propriétés dépassant celles de leurs contreparties mésophiles.

Une mise en évidence de la production de quatre enzymes hydrolytiques extracellulaires (protéase, amylase, cellulase et pectinase) par 12 souches fongiques et 13 souches bactériennes est réalisée. Ces microorganismes ont été isolés depuis l'eau thermale et le sol avoisinant des sources des eaux thermales à hammam Debegh, Guelma, Algérie. Les milieux de culture utilisés dans l'isolement sont le PDA pour les champignons et le GN pour les bactéries. Pour la mise en évidence de l'activité enzymatique, des différents milieux gélosés sont utilisés avec addition de substrat, spécifique pour chaque enzyme.

Les souches fongiques ont montrés clairement la capacité de chaque souche isolée et testée à produire au moins une enzyme. En effet, les cinq souches fongiques (S4, S5, S7, S10 et S11) sont capables de produire les quatre enzymes recherchées, alors que S1, S2 et S3 produisent uniquement les protéases, les deux souches (S8 et S12) présentent uniquement une activité pectinolytique, la souche (S6) quant à elle présente deux activités enzymatiques (amylase et pectinase) et la souche (S9) produit deux enzymes, il s'agit de la protéase et de la pectinase. Ces résultats ont permis la sélection de l'ensemble des souches fongiques préalablement isolées et testés pour leur identification. Les observations macroscopique et microscopique ont montré que les onze souches de moisissures sont réparties en cinq genres dont *Aspergillus* est dominant par 46%, suivi par *Penecillium* (27%), et enfin *Mucor*, *Fusarium* et *Rhizoctonia* par 9%. La S12 est l'unique levure isolée, elle est pectinolytique.

Pour les souches bactériennes, les résultats de la mise en évidence de la présence des quatre activités enzymatiques recherchées ont montré que toutes les souches possédaient une ou plusieurs activités hydrolytiques dominées par les activités protéolytiques et amylolytiques à l'exception des activités pectinolytiques, Les treize souches bactériennes isolées et testées ont été sélectionnées pour subir une caractérisation de type phénétique. En effet, l'identification des souches bactériennes sélectionnées a montré que ce sont des aéro-anaérobies facultatifs, thermophiles, se développent à 45°C sur gélose nutritive, la majorité de

ces souches sont immobiles, sous forme bâtonnet à Gram positif ou négatif avec des extrémités arrondies, ou sous forme de cocci et de coccobacilles isolés ou en longue chaîne, possédant une oxydase, la majorité sont catalase positive, dégradant le mannitol.

Les formes sporulantes représentent deux genres *Bacillus* et *Thermobacillus* avec la dominance du premier.

En effet, cette contribution à l'étude du potentiel biotechnologique des thermophiles peut être complétée d'abord par une identification plus poussée des souches isolées, en combinant l'approche phénotypique dont la chimiotaxonomie à l'approche moléculaire.

Concernant les enzymes, l'étude de leurs propriétés doit être menée à bout afin de pouvoir déterminer leur mécanisme catalytique et donc préciser avec exactitude leurs domaines d'exploitation. Pour une bonne rentabilité, il est important non seulement de déterminer les conditions optimales de production, les limites physiologiques d'excrétion de ces enzymes, mais aussi les paramètres de culture pouvant affecter l'activité enzymatique.

Références bibliographiques

A

Abou-Shanab R. A. I. (2007). Characterization and 16S rDNA identification of thermo-tolerant bacteria isolated from hot springs,” *Journal of Applied Sciences Research*, vol. 3, pp. 994–1000.

Agger T., Sphor A B., Carlesen M. et Nielsen J. (1998). Growth and product formation of *Aspergillus oryzae* during submerged cultivations verification of morphologically structured model using fluorescent probes. *Biotechnol. bioeng.* 57, 321-329.

Agrawal D., Patidar P., Banerjee T., Patil S. (2005). Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Proc. Biochem.*, 40; 1131–1136.

Aanniz T., Ouadghiri M., Melloul M. et al. (2015). Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes and desert soils,” *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 46, no. 2, pp. 443–453.

Aidoo E. F., Herdey R. et Wood B. J. B. (1981). Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *European J. Appl. Microbiol. Biochem.* 33, 6284-6294.

Akbache N. et Bariout S. (2007). Utilisation de planification expérimentale pour l’optimisation d’un milieu de culture à base de farine de dattes déclassées pour la production d’ α -amylase de *Rhizopus oryzae*. Mémoire d’ingénieur, INATAA, université Mentouri, Constantine, P: 42.

Alphones M., Jose D., ET Bernarda. (2004). Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. Ed. Wolters Kluwer, France 430 p.

Amaud A., Berset C., Bocquet J., Bouix M., Cerisie Y., Cuvellier EG.F., De Nettancourt D., Engasser J.M., GaW P., Goursaud J., Cnrenini M., Guiraud J.P., Richard, H., Steenbrugge, H., Teoule, E., Thomas, D. et Vandecasteele, J.P. (1993). *Biotechnologies*. 4ième ed., Scriban R. (éd), Technique et Documentation LavoisierE Paris, France, 904 p.

Amoozgar M.A., Fatemi Z.A., Karbalaei-Heidari H.R. and Razavi M.R. (2007). Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio sp.* strain AF-2004. *Microbiology Research*. 162: 369-377.

Aneja K. R. (2003). Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology. New Age International. 371-377. 81, 224-1494.

Antranikian G. (2009). Extremophiles and Biotechnology in: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 1-5 p.

Assamoi A.A., Destain J., Thonart P. (2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(2), 281–294.

Atlas R. M. & Bartha R. (1992). Microbial ecology. Fundamentals and applications. The Benjamin/Cummings Publishing Company. San Francisco, California (USA) : 3^{ème} édition, 563.

Aviron-Violet P., J.L. Baret, C. Bertrand, B. Blazy, F. Bouvier, M. Comtat, P.R. Coulet, P. Dupuy, J.F. Hervagault, A. Joyeau, J. Laurent, P. Monsaq, D. Thomas, P. Sicard et G.M.A. Van Beynum (1982). Les enzymes. Prùction et utilistion inùstrielles. Durand G. et P. Monsan (eds), Bordas, Paris, France, 349 p.

Aygan A., Arikan B., Korkmaz H., Dinçer S., Çolak Ö. (2008). Highly thermostable and alkaline α -amylase from a halotolerant alkaliphilic *Bacillus sp.* AB68. *Braz J Microbiol* 39: 547-553.

B

Babu K. R. et Satyanarayana T. (1993). Extracellular calcium inhibited α -amylase of *Bacillus coagulans* B49. *Enzyme Microbiol. Technol.* 15,1066-1069.

Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. & Ouzrout R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « arabia et kabyle ». *Science and Technologie*, 23: 30-37.

Bar M., Von Hardenberg J., Meron E and Provenzale A. (2002). Modelling the survival of bacteria in dry lands: the advantage of being dormant. *Proc. R 5 Soc. Lond B. Biol. Sci.* 269: 937-942.

Barbarous Ozer., GulsunAkdemir-Evrendilek. (2014). Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments. CRC Press. p : 13.

Baril E., Coroller L., Couvert O., El Jabri M., Leguerinel I., Postollec F. and Mafart P. (2012). Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus* spp. as a function of temperature, pH and a w. *Food microbiology*, 32(1), 79-86.

Barnabé S., Sasseville J. L., Tyagi R. D. et Valéro J. R. (2003). Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières ? VECTEUR environnement. 36 (2), 50-62 p.

Barnett H.L. and B.B., Hunter. (1998). Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 4th ed. APS Press, St. Paul, MN.

Beg O.K., Saxena R.K., Gupta R. (2002). Kinetic constants determination for an alkaline protease from *Bacillus mojavensis* using response surface methodology. *Biotechnol Bioeng.* 78: 289-295.

Bèguin P., Aubert J P. (1994). The biological degradation of cellulose, *fems, microbiol. Rev.* 13, P: 25-58.

Beldman G., Searle-Van Leewen M.F., Rombouts F.M., Voorzangen F.G.J. (1985). The cellulase of *Trichoderma viride*. Purification, characterisation and comparaison of al detectable endoglucannases, exoglucanases and α -glucosidases. *Eur J Biochem.* 146: 301-308.

Belmessikh, A., Boukhalfa, H., Mechakra-Maza, A., Gheribi-Aoulmi, Z., Amrane, A. (2013). Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillusoryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 44: 377–385.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2012.12.011>

Benaouida K. (2008). Etude de l'alpha amylase de levure isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Thèse magister. Biotechnologie microbiennes. Constantine. UM. 104p.

Benedykt W. and Katarzyana P. (2008). Regulation of bacterial protease activity. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 13: 212-229.

Benkahoul M., Belmessikh A., Boukhalfa H. et Mechakra-Maza A. (2017). Optimisation à l'aide d'un plan d'expériences de la production d'une protéase fongique sur milieu à base de déchets agro-industriels. **Journal Article, sciences et techniques** issue N°75

<https://doi.org/10.4267/dechets-sciences-techniques.3703>

Bergmeyer H.U., Gawekn K., et al. (1979). Principes de l'analyse enzymatique. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris. 17p.

Bernard Alin José Diena Alphonso meyer (2004). Cours de microbiologie générale et exercice corrigé.

Berraho E. (2009).Cours de Microbiologie Générale. Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire, B.P. 1014, Rabat.

Bertoldo C., Antranikian G. (2002). Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 151-60.

Beynon R.J., Oliver S. (2004). Avoidence of proteolysis in extracts. *Methods Mol. Biol.*, 596 : 81–93.

Bhat M K. (2000). Cellulases and related enzymes in Biotechnology. *Biotechnol Adv.* 18: 355-383 p.

Bio-Rad. (2007).Chapman - mannitol sait agar. www.afnor-validation.org.

Bocquet J. (1993). Généralités sur les micro-organismes. En 'Biotecnologie'. Ed. R. SCRIBAN. Tee. Doc. Lavoisier. Paris. 38-46.

Boiron P. (1996). Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P. 19-79.

Bornscheuer T. (2002). Microbial carboxylesterases. Classification, properties, and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 73-81 p.

Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y .et Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, 2ème Ed. Masson collection biotechnologies. 5-10.

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P. (1999). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. P. 12-426.

Boughlali M. (2003). Thermalisme et thalassothérapie en Algérie. Press. Therm. Climat., 140: 161-165.

Bouix M., et Leveau J-Y. (1991). Les levures Ds : Bourgeois C.M., Leveau J.Y., Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Ed. édition 2 Lavoisier-Tec &Doc, Paris. 3 : 206-229.

Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zucca J. (1989). Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P. 216-244.

Bousseboua H. (2005). Eléments de microbiologie. Campus-Club, Algérie : 2^{ème} édition, 179-199.

Bragger J.M., Daniel R.M., Coolbear T., Morgan H.W. (1989). Very stable enzymes from extremely thermophilic archae bacteria and eubacteria. Appl. Microbiol. And Biotech., 31:556-561.

Brasen C., Urbanke C., Schönheit P. (2005). A novel octameric AMP-forming acetyl-CoA synthetase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. FEBS Lett. 579: 477- 482.

Brock TD. (1978). Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures, Springer, Berlin, Germany.

Brock T.D., Madingan, M.T., Martingo, J.M. & Parker, J. (1994a). Metabolisme, Biosynthesis and Nutrition. En 'Biology of Microorganisms'. Prentice-Hall International, Inc. New Jersey. 89-124.

Bruins M. E., Janssen A. E. et Boom R. M. (2001). Thermozyms and their application : A review of recent literature and patents. Applied Biochemistry and Biotechnology. 90 (2), 155-186 p.

Buhot D. (1973). Echantillonnage de sols. Conservation et préparation des échantillons. Problème statistique. *Am. Phytopathol.* 5 : 296-298

Burhan A., Unaldi N., Coral G., Colak O., Aygan A., Gülnaz O. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* Isolate ANT-6. Process Biochem, 38: 1397-1403.

C

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.

Cavicchioli R, Amils D, McGenity T. (2011). Life and applications of extremophiles. Environ. Microbiol. 13: 1903- 1907.

Chabasse D., Bouchara J-P ; De gentile L., Brun S., Cimmon B., Penn P.(2002). Cahier de formation les moisissures d'intérêt médicale.

Chabasse D. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, Bioforma.France. pp. 25-27.

Chi Z., Ma C., Wang P., Li H.F. (2007). Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. Bioresour. Technol., 98; 534–538.

Chiba S. (1988). Amyloglycosidase. In: Handbook of Amylases and related enzymes (The Amylase Research Society of Japan, ed. Pergamum Press, Oxford, U.K. 104-116.

Clark H. E., Geldriche E. F. B., Kabler P. W. & Huff C. B. (1985). Identification of Industrial microorganismes. Appl. Microbiol. Process Biochem. **30**: 723-727.

Clarke P.H., Steel K.J. (1966). Rapide and simple biochemical tests for bacterial identification. Academic press. London. pp. 111.

Coulibaly L. & Agathos S.N. (2003). Transformation kinetics of mixed polymeric substrates under transitory conditions by *Aspergillus niger*. African J. Biotechnol. **2** (11): 438-443.

Coultouly G. (1991). Génie enzymatique. Masson. Paris. France. pp. 244.

Cuveillier G. F. (1999). Réacteurs enzymatiques à enzymes libres. In Scriban R. (Ed): Biotechnologie. Ed. Lavoisier. 401-425.

D

Davet P. (1996). Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide.

Mémoire de Magister : En Microbiologie Appliquée, Option : Biotechnologies Microbiennes. Constantine : Université Mentouri Constantine, 102p.

Dauter Z., Dauter M., Brzozowski A.M., Christensen S., Borchert T.V., Beier J.L., Wilson K.S. et Davies G.J. (1999). X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alphaamylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7Å resolution. *Biochem.* (38): 8385-8392.

Debananda S., Pintubala K., Suchitra S., Salam N. (2009). Screening, identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkali thermotolerant indigenous actinomycetes. *World. Appl. Sci. J.*, 7 : 907-916.

Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire: Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier 476 p.

Delarras C. (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire , Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Edition Lavoisier .P :113 ,114.

De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 ed., The Firmicute. Springer. New York. Volume Three. 63-67.

Dey G., Palit S., Banerjee R. et Maiti B. (2002). Purification and characterization of maltooligosaccharides forming amylase from *Bacillus circulans* GR 9313. *Ind. Microbiol.biotechnol.* 4,193-200.

Dinsdale A.E., Halket G., Coorevits A., Van Landschoot A., Busse H.J., De VOS P., Logan N.A. (2011). Emended descriptions of *Geobacillus thermoleovorans* and *Geobacillus thermocatenulatus*. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, 61, 1802–1810.

Dinu D., Nechifor M. T., Stoian G., Costache M., & Dinischiotu A. (2007). Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. *Journal of biotechnology*, 131(2), 128-137.

Djouldé Darman R. (2005). Screening des microorganismes à potentialités fermentaires pour le manioc. Ed. AFNOR, Saint-Denis-la-plaine, France, P: 300.

Drouin M. (2005). Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maître ès sciences (M.Sc.). Canada.

Duchaufour P. (1965). Précis de pédologie. Paris : 2^{ème} édition, 481 p. **Dvail, S., Grety, J. et Lenzini, M. (2010).** Les actinomycètes, source de biomolécules d'intérêt industriel. Haute école de la province de Liège.

E

Egas M. C., Da Cota M. S., Cowman D. A. et Pieres E. M. (1998). Extracellular α -amylase from *Thermus filiformis* ork A2 : purification and biochemical characterization. *Extremophiles*. 2(1) : 23-32.

Ertan F. et Balkan B. (2007). Production of α -Amylase from *Penicillium chrysogenum* under Solid-State Fermentation by Using Some Agricultural By-Products. *Food Technol. Biotechnol.* 45 (4), P: 439-442.

Euzéby. (2008). Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire. Ed. Lavoisier, Paris. 832p.

F

Feller G., Lonhienne T., Deroanne C., Libioulle C., Van beeumen J. et Gerday C. (1992). Purification, Characterisation and nucleotide sequence of the thermolabile α -amylase from the Antarctic psychrotroph *Alternomonas haloplanctis* A23. *J. Biol. Chem.* 267(8) : 5217-5221.

Fergani et Lakhel (2015). Activités cellulolytiques de *Trichoderma longibrachiatum* cultivée sur son de blé. Mémoire Master : Biotechnologie des mycètes. Constantine : Université Mentouri, 56.

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

Ferrero M.A., Castro G.R., Abate C.M., Baigori M.D., Sineriz F. (1996). Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45; 327–32.

Fogarty W.M., et Kelly C.T. (1980). Amylase, amyloglucosidase and related glucanases. In Rose (A.H.) Ed. Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversion. London: Academic Press, Vol. 5, 115-170 p.

Frazier W.C. (1967). Food microbiology. Academic presse. London. P. 3-429.

G

García-Gómez M.J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragán L.A. (2009). Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. Food Chem., 112; 604–608.

George S., Raju V., Krishnan M.R.V., Subramanian T.V., Jayaraman K. (1995). Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. Proc. Biochem., 30; 457–462.

Germano S., Pandey A., Osaku C.A., Rocha S.N., Soccol C.R. (2003). Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. Enzyme Microb. Technol., 32; 246–251.

Giraud J. (1998). Microbiologie alimentaire . Edition Donod, Paris. p 8-101.p 330.

Gomri (2012). Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermales terrestres de l'Est algérien. Mémoire Master : Biotechnologie Alimentaire. Constantine : Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (INATAA), 81p.

Gordonr E., Haynesw C., Pang c.H.N. (1973). The Genus *Bacillus* (Agricultural Handbook no. 427). Washington DC: United States Department of Agriculture.

Grabner M., Combes D. (1989). Microbial α -amylases: Enzyme and Microbiol Technology. 2: 663-687.

Granner D.K., Murray R.K., Rodwell V.W. (2008). Biochimie de HARPER. 3^{ème} édition. De Boeck. Bruxelles., 47. pp. 49-51, 483.

Gregoire P., Fardeau ML., Guaso S., Bouanane A., Michotey V., Bonin P., Dubourg K., Cambar J., Ollivier B. (2009). Les micro-organismes de l'extrême. Press therm climat. 146 : 49-61.

Guiraud J. P. (1998). Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. P. 7-330.

Gupta R., Beg Q. K. and Lorenz P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 15-32.

Gupta R., Gigras P., Mohapatran H., Goswami K.V., Chauhan B. (2003). Microbial α - amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 38: 1599-1616.

H

Hajji M., Kanoun S., Nasri M., Gharsallah N. (2007). Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Proc. Biochem.*, 42; 791–797.

Harrigan W.F. & McCance M.E. (1976). Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press. London. P. 21-277.

Harley J.P., Prescott L.M. (2002). Laboratory Exercises in Microbiology, 5 Th Ed., 449P.

Hasper A.A., Dekkers E., Mil M.V., Van de Vondervoort P.J.I., De Graaff, L.H. (2002). Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl Environ Microbiol* 68(4): 1556-1560.

Holden J.F. (2009). Extremophiles: Hot Environments in *Encyclopedia of microbiology*, 3rd Ed., Schaechter M. P: 127-146. Elsevier.

Hoorman J. J. et Islam R. (2010). Understanding soil microbes and nutrient recycling. FACT SHEET. Agriculture and Natural Resources. The Ohio State University, 1-5.

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., 1-12.

Huber R., Huber H., Stetter K. O. (2000). Towards the ecology of hyperthermophiles : biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. *F.E.M.S. Microbiol. Rev.*, 24(5), 615–23.

I

Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E., Karam N.E. (2009). Lactic acid bacteria from “Sheep’s Dhan”, a traditional butter from sheep’s milk: Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites*, vol 60 n°2, pp 177-183.

Ikasari L. & Mitchell D. A. (1994). Proteases production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10** : 320-324.

j

Jahir A. K., Ruchika P. (2011). A study on partial purification and characterization of extracellular amylases from *Bacillus subtilis*. *Pelagia Research Library*. 2 (3):509- 519.

Jayani R.S., Saxena S. & Gupta R., (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, **40**, 2931-2944

Joffin JN. and Leyral G. (2006). *Microbiologie Technique Tome 1 ” Dictionnaire des techniques”*. CRDP AQUITAINE. Bordeaux. 189-250.

Jouani J-P. et et yiannicouris A. (2002). Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir, leurs effets chez l’animal. *INRA ; Production animale* **15 (1)**, pp.3-16.

Julien R. (2002). Les moisissures parlons-en. *Objectif prevention*. **25 (4)**: 7-8.

K

Kader A.J., Omar O., and Feng L.S. (1999). Isolation of cellulolytic fungi from the bario Highlands, Sarawak. University of Kebangsaan, Malaysia. *Review of Biodiversity and Environmental Conservation*.

Kalisz H.M. (1988). Microbial proteinases. *Advances in Biochemistry and Engineering Biotechnol.*, **36** : 1-65.

Karbalaei-Heidari H.R., Amoozegar M.A. and Ziaee A.A. (2009). Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* ; **36**: 21- 27.

- Kathiresan K. et Manivannan S. (2006).** α -amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. African Journal of Biotechnology Vol. 5 (10), P: 829-832.
- Kaur J., Chadha B.S., Kumar B.A. and Saini H.S. (2007).** Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus sp.* MTCC 3922. Biores Technology; 98: 74-81.
- Kawasaki Y., Aoki M., and Makino Y. (2012).** Characterization of moderately thermophilic bacteria isolated from saline hot spring in Japan," Microbiology Indonesia, vol. 5, pp. 56–60.
- Kedaïd F.Z. (2007).** Database on the geothermal resources of Algeria. Geothermics; 36: 265-275.
- Kelly C.T., Bolton D. J., Fogarty W.M. (1997).** Bi-phasic production of α -amylase of *Bacillus flavothermus* in batch fermentation Biotechnology. 19-7:675-677.
- Khoo S. L., Amirul A. A., Kamaruzaman M., Nazalan N. et Azizan M. N. (1994).** Purification and characterization of α -amylase from *Aspergillus flavus*. Folia Microbiol. 39(5) : 392-398.
- Korish M. (2003).** Production, purification, properties and application of the cellulose From a wild type strain of a yeast isolate. Faculty of biology, Johannes gutenberg-University, mainz, germany.
- Kreger -Van rij N.J. (1984).** The yeast, a Taxonomic Study, Elsevier Biomedical.
- Krisstjansson J.K. et Hreggvidsson, G.O. (1995).** Ecology and habitats of extremophiles. World J. of Microbiol. and Biotech., 11:17-25.
- Kumar A.G., Nagesh N., Prabhakar T.G., Sekaran G. (2008a).** Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes sp.* Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. Bioresour. Technol., 99; 2364–2372.

L

Lammi S. (2011). Recherche de substances à activités antimicrobiennes (antibactériennes et anticandidoses) produites par des souches levuriennes isolées des sols sahariens. Département de Biochimie et de Microbiologie. Université Mentouri. Thèse de Magistère, Constantine. 91p.

Larparent-Gourgaud M. & Sanglier J. J. (1992). Biotechnologies. Principes et méthodes. Doin. Paris. P. 574-587.

Larparent J. P. & Larparent G. M. (1990). Mémento technique de microbiologie. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 471 p.

Laxman R.S., Sonawane A.P., More S.V., Rao B.S., Rele M.V., Jogdand V.V., Deshpande V.V., Rao M.B. (2005). Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. Proc. Biochem., 40; 3152–3158.

Leisola M., Jokela J., Pastinen O., Turunen O. (2001). Industrial use of enzymes. *Laboratory Bioproc. Eng.*, Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.

Lekchiri S., Moueqqit M., Lekchiri A. (2006). Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. Faculté des Sciences, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohamed Ier, Oujda, Maroc.

Leveau S. B. & Bouix M. (1993). Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier Apria. P. 110-163.

Li W. F., Zhou X. X. et Lu P. (2005). Structural features of thermozyms. *Biotechnology Advances*. 23 (4) : 271-281.

Liese A., Seelbach S., Wandrey C. et Wileyu V C H. (2000). Industrial biotransformations.

Lonsane B. K., Ramesh M. V. (1990). Production of bacterial thermostable α - amylase by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. In: *Advances in applied microbiology*, vol. 35. San Diego: California Academic Press:1-56.

Lucio de Souza E., Erika M. E. H., Castilho V. M., Delima A., Bellini M. Z., Cruz D. Et Cruz Z. R. (1996). Purification and characterization of α -amylase from *Rhizopus* sp. *Arq. Biol. Technol.* 39 (4), 831-839.

M

Madigan MT, Marris BL. (1997). Gli estremofili. *Le Scienze* 346: 78-85.

Maier, R. M., Pepper, I. L. et Gerba, C. P. (2000). Microorganisms in surface soils. *In: Environmental microbiology.* Academic press. A Harcourt Science and technology company. Canada , 79-82.

Mala, B.R., Aparna, M.T., Mohini, S.G., Vasanti, V.D. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 597-635.

Malkawi H. I. and Al-Omari M. N. (2010). Culture-dependent and culture-independent approaches to study the bacterial and archaeal diversity from jordanian hot springs,” *African Journal of Microbiology Research*, vol. 4, no. 10, pp. 923–932.

Martínez Trujillo A., Arreguín Rangel L., García, Rivero M., & Aguilar Osorio G. (2011). Use of fruit residues for pectinase production by *Aspergillus flavipes* FP-500 and *Aspergillus terreus* FP-370. *Letters in applied microbiology*, 53(2), 202-209.

Maugeri T. L., Gugliandolo C., Caccamo D. and Stackebrandt E. (2001). A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from shallow, marine vents,” *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 24, no. 4, pp. 572–587.

Mayer F., Küper U., Meyer C., Daxer S., Müller V., Rachel R., Huber H. (2012). AMP-forming acetyl coenzyme A synthetase in the outermost membrane of the hyperthermophilic crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*. *J. Bacteriol.* 194: 1572-1581.

Meunier N.E., (1999). Valuation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales. *M.Sc Thesis, INRSETE, Univ. Quebec.* Canada. 1-168 p.

Meziani et Mahcen (2017). Activités hydrolases des souches fongiques. Production par fermentation de cellulase et d' α -amylase par *Penicillium. sp* sur substrat solide. Mémoire : Microbiologie, Option : Biotechnologie des Mycètes : Fermentation et production de substances fongiques. Constantine : Université Mentori , 55 p.

Mihail J.D , Alcoren S.M. (1987). *Marcophomina phaseolma* spatial patterns in cultivated and sampling strategies. *Phytopathology*. 77 : 1126-1131.

Monson P. (1985). Les enzymes biofutur. 35 : 25 - 28.

Morel R. (1989). Les sols cultivés. Lavoisier. Paris.

Mukherjee A. K., Adhikari H. and Rai S. K. (2008). Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrical* grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal*. 39: 353-361.

N

Nascimento W.C.A., Martins M.L.L. (2004). Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus sp.* *Braz J Microbiol*. 35: 1-2.

Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau 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 uzonensis* 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.

Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T. & Killington R. (2000). L'essentiel en microbiologie. Berti. Paris. P. 210-216.

Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M., Antranikian G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 711-729.

Nobel e-Museum. (2004). Nobel Prize. Eduard Buchner

<http://nobelprize.org/chemistry/laureates/1907/>

O

Oikawa T. (1998). Endo-glucanase secreted by a Psychrotrophic yeast: purification and

Ouali S., Khellaf A., Baddari K. (2007). Etude des ressources géothermiques du sud algérien. *Revue des Energ. Renouv.*, 10 (3) : 407-414.

Oshima T., Moriya T. (2008). A preliminary analysis of microbial and biochemical properties of high-temperature compost. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1125:338-344.

Oteng-Gyang K. (1984). Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chaud. Lavoisier. Paris. P. 26-42.

P

Pandey A., Nigam P., Soccol C. R., Soccol V. T., Singh D., Mohan R. (2000).

Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem.* 31:135-52.

Patel R., Dodia M., Singh S.P. (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. : Production and optimization. *Proc. Biochem.*, 40; 3569– 3575.

Pelmont J. (1995). Enzymes : Catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire de Grenoble. 7; 621. 652-654.

Perry I. I. and Staley I. T., (1997). Taxonomy of eubacteria and archaea,” in *Microbiology: Diversity and Dynamics*, II. Perry and IT. Staley, Eds., pp. 388–413, Saunders College Publishing, Orlando, Fla, USA.

Perry Jerome Derry James Staly Stephen Lory. (2004). microbiologie cours et question de révision.

Phaff H-G., Miller M-W and Mrak E-K., (1978).The life of yeasts. Harvard University Press, Cambridge, Massachsetts.

Pol D., (1996).Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire.ellipses édition marketing S.A, Paris. 15: 20-38, 42-57, 141-151.

Ponce A., Stephanie A. C and Pun T. Y. (2008). Detection and viability assessment of endospore-forming pathogens." Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems. Springer New York. 481- 523.

Punt P. J., Van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J. & Van den Hondel C. (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* **20** (5): 200-206.

Q

Quérellou J., Guézennec J. (2010). Biotechnologie des extrêmophiles. Editions Tech. Ing. BIO. 580, 1-13.

R

Raddadi N, Cherif A, Daffonchio D, Mohamed N, Fava F. (2015). Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**: 7907-7913.

Rambaud J-C., Buts J-P., Corthier G., Flourié B. (2004). Flore microbienne intestinale: physiologie et pathologie digestives. Edn John Libbey Eurotext, Paris. 3-245 p.

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**; 597-635.

Ray R. R. (2001). Production of α -amylase and xylanase by an alkalophilic strain of *Penicillium griseoroseum* RR-99 *Acta Microbio. Pol.*, **50**(3-4) : 305-309.

Receveur V., Czjek M., Schulein M., Panine P., Henrissat B. (2002). Dimension, shape, and conformational flexibility of two domaine fungal cellulases in solution probed by small angle X-ray scattering. *J Biol Chem.* **277** (43): 40887-40892.

Reddy L. V., Wee Y.-J., Yun J.-S. and Ryu H.-W. (2008). Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus sp.* RKY3 through Plackett Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Technology*, **99**: 2242-2249.

Rinaldi C., Sutton A. & Fothergill S. R. (1998). The morphology of fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 123-129.

Rodríguez-Fernández D., Rodríguez-León J., De Carvalho J., Sturm W., & Soccol C. (2011). The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 102(22), 10657-10662.

Rocha E.P., Matic I. and Taddei F. (2002). Over-representation of repeats in stress response genes: a strategy to increase versatility under stressful conditions *Nucleic. Acids. Res.* 30: 1886-1894.

Ronald K.S., Harold S.L. (1970). Methods for the isolation of proteolytic marine bacteria. *Appl. Microbiol.* 20 : 991-992. In : Shivanand P., Jayaraman G. (2009). Production of extracellular protease from halotolerant bacterium *Bacillus aquimaris* VTTP4 isolated from kumta coast. *Process Biochem.* 44 : 1088-1094.

Ruohonen L., Penttilä M. et Keränen S. (1991). Optimisation of *Bacillus* α -amylaseproduction by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biotechnol.* 7(4) : 337-346.

S

Saadoun I., EL. Momani I. (1997). Stryptoyces from Jordan soil active against *Agrobacterium tumefasciens*. *Actinomycetes.* 8(12) : 29-36.

Saci a., 2012. Production d'alpha-amylase par *Streptomyces* sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange. thèse magister. *Gestion des Déchets : Evaluations et Solutions environnementales.* Constantine. Université Mentouri. 92p.

Saha B.C., Freer S.N., Bothast R.J. (1994). Production, purification and proprieties of a thermostable (beta)-glucosidase from a color variant strain from *Aureobasidium pullulans*. *Appl Environ Microbiol* 60(10): 3774-3780.

Sahoo D.K., Das A., Thatoi H., Mondal K.C., Mohapatra P.K. (2012). Keratinase production and biodegradation of whole chicken feather keratin by anewly isolated bacterium under submerged fermentation, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 167 : 1040-1051.

Saibi H. (2009). Geothermal resources in Algeria. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*; 13:2544–2552.

Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G. and Pandey A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40: 2689-2694.

Sathya R., Pradeep B.V., Angayarkanni J., Palaniswamy M. (2009). Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agroindustrial wastes. *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, 14; 765-794.

Satyanarayana T., Raghukumar Ch., Roswall T. and Shivaji S. (2005). Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *current Science* 89:1.

Saxena S., Shukla S., Thakur A., & Gupta R. (2008). Immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* onto activated polyethylene and its application in apple juice clarification. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 55(1) :33-51.

Scholler H. (1962). Les eaux souterraines hydrologie dynamique et chimique, recherche, exploitation et évaluation des ressources. Edit. masson. Paris. 642.

Scriban R. (1993). *Trichoderma reesei* exhibit true reversion and a high exchange rate on crystalline cellulose. *Biotechnologie*. P : 32-690, 4^{ème} édition.

Simon P. et Meunier R. (1970). Microbiologie industrielle et génie biochimique. Masson et Cie, Paris, France, 567 p.

Singh A. (1999). Engineering enzyme properties, *Indian Journal of Microbiology*, 39 (2), 65–77 p.

Singleton P. (2005). Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies, (6th edn) DUNOD. Paris.

Sinsuwan S., Rodtong S., Yongsawatdigul J. (2008). Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. *Proc. Biochem.*, 43; 185–192.

Sierra G.A. (1957). Simple method for the selection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*; 23:15-22.

Smith n R., Gordon R.E., Clark F.E. (1952). Aerobic spores-forming bacteria. J. Appl. Bact. 27 : 78-99.

Soares V.F., Castilho L.R., Bon E.P.S., Freire D.M.G. (2005). High-yield *Bacillus subtilis* protease production by solid-state fermentation. Appl. Biochem. Biotechnol., Vol. 121– 124.

Souza A. N. and Martins M. L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*, Brazilian Journal of Microbiology, vol. 32, no. 4, p. 1517.

Sunna A, Bergquist PL. (2003). A gene encoding a novel extremely thermostable 1,4-beta-xylanase isolated directly from an environmental DNA sample. Extremophiles 7: 63-70.

T

Tamura and Takeichi K. Y., Otozai K., Yamasaki M., Yamazaki G. H., Ohmura K. A., Nakayama Y. (1983). Alpha-amylase genes (amy R2 and amy E+) from an alphaamylase hyperproducing *Bacillus subtilis* strain: nucleotide sequences and. molecular cloning J. Bacteriol., 156 (1), P: 327.

Tankeshwar A. (2013). Catalase test: principle, uses, procedure and results. Biochemical Tests for Gram Negative Bacteria. <http://www.microbeonline.com>.

Tarr S. (2004). Yeasts from Lesotho - Their classification and possible applications. Thèse de doctorat. Faculty of Natural and Agricultural Sciences. University of the Free State. South Africa.

Tatiana da Costa RP. and Flevo F. (2005). Extraction and assay of pectic enzymes from Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Food Chem. 89, 85-92 p.

Tatsinkou F.B., Taveai F. and Ndjouenkeui R. (2005). Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. Africcan Journal of biotechnology., 4(1), P: 14-18.

Thomas Brock and Mercedes Edwards R. (1969). Fine Structure of *Thermus aquaticus*, an extreme thermophile, J. Microbiol. 104 (1) : 509-517.

Tobe S., Takami T., Ikeda S., Horikoshi K. (1976). Production of some enzymatic properties of alkaline protease of *Candida lipolytica*. Agric. Biol. Chem., 40; 1087–1092.

U

Uchikoba T., Mase T., Arima K., Yonezawa H. & Kaneda M. (2001). Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. *Biol. Chem.* **382**: 1509-1513.

Üiger C. et Çurakoğ Ç. (2001). α -amylase production by *Bacillus Subtilis* and *B.amyloliquefaciens* in different PEG solution. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 93-94.

Ui-haq I., Mukhtar H., Daudi S., Sikander A., and Quadeer M. A. (2003). Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab condition. *Biotechnology* **2** (1) : 30-36.

Ulacio D., Perez C., Pineda Y.J. (1997). Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in Portuguesa state, Venezuela. *Bioagro.* **9** (1): 3-11.

V

Van Behen J. B. and Z. Li. (2002). Enzyme technology: an overview. *CUITent Opinion in Biotechnology*, **13** :338-344.

Van den Burg B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in microbiology.* **6** : 213-218.

Van der Maarel MJ., Van der Veen B., Uitdehaag JC., Leemhuis H., Dijkhuizen L. (2002). Properties and application of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotechnol.* **94**: 137-155.

Vieille C., Zeikus G.J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**:1-43.

Vincent M. (1996). Blood glucose: Its measurement and clinical importance. *Clinica Chimica*.

Vukelić B., Ritonja A., Renko M., Pokorny M., Vitale L. J. (1992). Extracellular α -amylase from *Streptomyces rimosus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37** : 202-204. Fiche technique sur la pomme de terre. Disponible en ligne sur : www.inra.fr.

W

Wang C-Y., Ng C-C., Tzeng W-S., Shyu Y-T. (2009). *Marinobacter szutsaonensis* sp. nov., isolated from a solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2605-2609.

Wiegel J. (1990). Temperature spans for growth: a hypothesis and discussion. *F.E.M.S. Microbiol. Rev.*, 75:155-170.

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

Wild (1993). Soils and the environment. An introduction. *In: Cambridge price editions*. Cambridge university press. 281 p.

Woese CR., Fox GE. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74: 5088-90.

Wu T.Y., Mohammad A.W., Jahim J.Md., Anuar N. (2006). Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme Microb. Technol.*, 39; 1223–1229.

Z

Zeikus J. G., Vieille C. et Savchenko A. (1998). Thermozyms : biotechnology and structure- function relationships. *Extremophiles*. 2 (3), 179-183 p.

Zeni J., Pili J., Cence K., Toniazzo G., Treichel H., & Valduga E. (2015). Characterization of novel thermostable polygalacturonases from *Penicillium brasilianum* and *Aspergillus niger*. *Bioprocess and biosystems engineering*. 38 (12), 2497-2502.

Zoran M., Valérie S., Guy H. (2006). Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *C.R. Biologies*. 329 : 527-540.

Site web

<http://www.bdsp.ehesp.fr/Base/104525/>

Annexes

Annexe 01 : Solutions

➤ Eau physiologique

Chlorure de sodium.....	9g
Eau distillée.....	1000ml

➤ Solution de chlorure de sodium (NaCl) 1M

Chlorure de sodium.....	58,44g
Eau distillée.....	1000ml

Annexe 02 : Milieux pour l'isolement et la purification

➤ Milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre	200g
Glucose	20g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml

- Laver la pomme de terre et la couper en petit cubes
- Mettre dans 500 ml d'eau distillée et porter à l'ébullition pendant 1 heure.
- Ecraser et filtrer la pomme de terre afin d'obtenir l'extrait
- D'autre part, faire fondre l'agar dans un petit volume d'eau distillée
- Ajouter le filtrat à la solution d'agar
- Ajouter le glucose
- Ajuster le volume à 1000 ml
- Agiter le milieu jusqu'à homogénéisation
- Stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 20 min

➤ Gélose nutritive (GN)

Extrait de viande	10g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar.....	15g
Eau distillée	1000ml

pH= 7,4

Annexe 03 : Milieux pour les tests enzymatiques

➤ Milieu lait gélosé à 20 % d'agar

Lait écrémé	100g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

- Dissoudre l'agar dans de l'eau distillée chaude
- Agiter jusqu'à homogénéisation pour obtenir l'eau gélosée
- Stériliser par autoclavage à 121 ° C pendant 20 min.
- Ajouter le lait écrémé stérile juste avant l'utilisation du milieu

➤ Milieu gélosé à 5% de lait écrémé

Lait écrémé	50ml
Agar.....	10g
Eau distillée.....	1000ml

➤ Milieu PDA à 1% d'amidon

Extrait de pomme de terre	1000ml
Amidon	10g
Glucose	20g
Agar	20g

- 200g de pomme de terre non pelées vieilles sont lavés et coupés en petites dés ensuite mis dans un litre d'eau distillée et portés à ébullition pendant 1 heure , ils sont enfin écrasés, filtré ,compléter à 1L d'eau distillée
- L'agar et l'amidon sont dissous à chaud dans l'extrait de pomme de terre. Compléter à un litre d'eau distillée, ajuster le pH à 5 et stériliser à 110°C, pendant 30 min.

➤ Milieu gélose à amidon 1%

Gélose nutritive.....	1000ml
Amidon.....	10g

➤ Milieu (CMC-agar)

CMC	20g
Extrait de levure	5g
Agar	15g
Eau distillé.....	1000ml

pH=5

➤ **Milieu gélosé à 0,5% de CMC**

Gélose nutritive.....	1000ml
CMC.....	5g

➤ **Milieu pectine-agar**

Pectine.....	5g
Extrait de levure.....	5g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

Annexe 04: Les indicateurs colorés

➤ **Rouge Congo à 0.1%**

Rouge Congo	0.1g
Eau distillé	100ml

- Dissoudre 0.1g de Rouge Congo dans un petite volume d'eau distillée puis compléter le volume jusqu'à 100ml

➤ **Eau iodée (Lugol)**

Iode	1g
Iodure de potassium	2g
Eau distillé	100ml

- Dissoudre 2g d'iodure de potassium dans un peu d'eau distillée puis ajouter 1g d'iode, ensuite compléter à 100ml d'eau distillée (ajouter éventuellement un peu d'iode pour permettre la dissolution totale de l'iode).

➤ **Acétate de cuivre à 0,7%**

Acétate de cuivre.....	7,5g
Eau distillée.....	1000ml

- Dissoudre 7,5g de l'acétate de cuivre dans un petite volume d'eau distillée puis compléter le volume jusqu'à 100ml

Annexe 05 : Lactophénol-bleu coton

Phénol en cristaux	20g
Acide lactique (25%).....	20ml
Glycérol.....	20ml
Eau distillée.....	4ml
Bleu de méthylène.....	0,5g

Annexe 06 : Réactifs de la coloration de Gram

➤ Violet de gentiane

Violet de gentiane.....	1g
Alcool éthylique à 95%	10ml
Phénol.....	2g
Eau distillée.....	100ml

➤ Lugol de Gram

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

➤ Fuschine de ziehl (Guiraud et Galzy, 1980).

Fuschine.....	1g
Alcool éthylique à 95%.....	10ml
Phénol ajoutés à 100ml d'eau distillée.....	5g

Annexe 07 : Milieux pour les tests biochimiques des bactéries

➤ Milieu gélose viande-foie

Extrait de viande.....	10g
Peptone	20g
Extrait de levure.....	10g
Glucose.....	05g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

pH= 7,6

➤ **Milieu Mannitol mobilité (Guiraud, 1998)**

Peptone.....	20g
Nitrate de potassium.....	1g
Mannitol.....	2g
Rouge de phénol.....	40mg
Agar.....	4g
Eau distillée.....	1000ml

pH= 7,6-7,8

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

Peptone.....	20g
Agar.....	12g
Lactose.....	10g
Sucrose.....	10g
NaCl.....	.05g
Extrait de levure.....	03g
Extrait de viande	03g
Glucose	01g
Citrate de fer.....	03g
Na ₂ S ₂ O ₃	0,3g
Rouge de phénol	0,025g
Eau distillée.....	1000ml

pH= 7.4 ±0.2

Annexe 08 : Milieux sélectifs pour l'identification des bactéries

➤ Gélose Hektoen

Peptone pepsique de viande.....	12g
Extrait autolytique de levure.....	3g
Lactose.....	12g
Saccharose	12g
Salicine.....	2g
Sels biliaires	9g
Chlorure de sodium.....	5g
Thiosulfate de sodium	5g
Citrate ferrique ammoniacal	1,5g
Bleu de bromothymol	65mg
Fuchsine acide	45mg
Agar agar bactériologique	13,5g

pH= 7,6 ± 0,2.

➤ Gélose au sang cuit (Milieu chocolat)

Gélose nutritive	1000ml
Sang de cheval	50ml

➤ Milieu Chapman

Peptones.....	11g
Extrait de viande.....	1g
Chlorure de sodium.....	75g
Mannitol.....	10g
Rouge de phénol.....	0,025g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

➤ **Gélose au sang base**

Mélange spécial de peptones	23g
Amidon.....	1g
NaCl.....	5g
Sang frais.....	50ml
Agar.....	15g

pH= 7,3

Résumé

ملخص

كجزء من البحث عن الإنزيمات التي تنتجها الكائنات الحية الدقيقة المحبة للحرارة (الترموفيلية) المعزولة من المياه الحرارية والتربة المجاورة للينابيع الحرارية الموجودة في حمام الدباغ، قالمة، الجزائر. أحد عشر سلالة من الفطريات، خميرة و ثلاثة عشر سلالة بكتيرية تم تنقيتهم واختبار نشاطهم الإنزيمي ومن ثم تحديدهم.

النشاطات الإنزيمية التي تم البحث عنها (تحليل البروتين، النشاء، كربوكسي ميثيل سلولوز و البكتين) عند السلالات الفطرية و البكتيرية المعزولة تم اختبارها باستخدام مركبات خاصة بكل نشاط إنزيمي . جميع السلالات الفطرية والبكتيرية لها نشاط إنزيمي واحد على الأقل، هذا يسمح باختيار كل هذه السلالات بهدف تحديدها. تشير النتائج إلى ثراء موقع أخذ العينات (المياه الحرارية والتربة) بسلالات فطرية وبكتيرية قادرة على إنتاج أنشطة إنزيمية هامة. في الواقع هذا الموقع هو مصدر محتمل لإنزيمات تملك القدرة لمقاومة الحرارة وبالتالي غاية في الأهمية لتطبيقاتها في الهيادين الصناعية.

الدراسة الظاهرية والمجهريّة للسلالات الفطرية الأحد عشر المعزولة والتي تم اختبارها واختيارها أظهرت أنها تمثل 5 أنواع (الرشاشيات، البنسليوم، العفنة، الفيوزاريوم ورايزوكتونيا). الرشاشيات والبنسليوم كانت أكثر الأنواع بروزا.

دراسة الخصائص الظاهرية للسلالات البكتيرية سمحت بتحديد بعض خصائصها المورفولوجية ، البيوكيميائية و الفيزيولوجية حيث أظهرت وجود نوعين (العصيات و التارموباسيلس) مع هيمنة جنس العصيات بالإضافة إلى أجناس الاختبارات كفيّة بتحديدّها، ممثلة في شكل cocci و coccobacilles. أخرى لم تكن

Dans le cadre de la recherche d'enzymes produites par des microorganismes extrémophiles isolés depuis l'eau thermale et le sol avoisinant des sources thermales se trouvant à hammam, Debegh, Guelma, Algérie. Onze souches de moisissures, une levure et treize souches de bactéries ont été purifiées puis testées pour leur activité catalytique et finalement identifiées.

Les activités enzymatiques recherchées (protéolytiques, amylolytiques, cellulolytiques et pectinolytiques) chez les souches fongiques et bactériennes isolées sont testées sur un milieu spécifique pour chaque activité enzymatique. La totalité des souches fongiques et bactériennes présentent au moins une activité enzymatique. Ce qui permet la sélection de l'ensemble de ces souches pour leur identification.

Les résultats indiquent la richesse de l'échantillon prélevé de souches fongiques et bactériennes capables de produire d'importantes activités enzymatiques. En effet, l'eau thermale et le sol environnant ces sources chaudes sont une source potentielle d'enzymes pouvant être thermorésistantes et donc très intéressantes pour leurs applications industrielles.

L'étude macroscopique et microscopique des souches fongiques a montré que les onze souches de moisissures isolées, testées et sélectionnées représentent 5 genres (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium* et *Rhizoctonia*). Les genres les plus dominants sont *Aspergillus* et *Penicillium*.

La caractérisation phénétique réalisée pour les souches bactériennes a permis d'avoir accès à certaines propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques de ces microorganismes. Les résultats ont montrés la présence de deux genres connus, *Bacillus* et *Thermobacillus* avec la dominance du genre *Bacillus*. Ainsi que, d'autres genres dont les tests réalisés sont insuffisants pour les identifier.

As a part of a search for enzymes produced by extremophilic microorganisms isolated from the thermal water and the surrounding soil of thermal sources located in hammam, Debegh, Guelma, Algeria. Eleven fungal strains, one yeast and thirteen bacterial strains were purified, then tested for their catalytic activity, and finally identified.

The desired enzymatic activities (proteolytic, amylolytic, cellulolytic and pectinolytic) of isolated fungal and bacterial strains were tested on a specific medium for each enzymatic activity. All the fungal and bacterial strains have at least one enzymatic activity. This allows the selection of these strains for their identification.

The results indicated the richness of the sampling site (thermal water and soil) in fungal and bacterial strains capable of producing important enzymes. Indeed, this site is a potential source of enzymes that can be thermo-resistant and therefore very interesting for their industrial applications.

The macroscopic and microscopic study of the fungal strains showed that the eleven isolated strains, tested and selected represent 5 genera (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium* and *Rhizoctonia*). The most dominant genera are *Aspergillus* and *Penicillium*.

The phenetic characterization performed for bacterial strains allowed to have an access to certain morphological, biochemical and physiological properties of these microorganisms. The results showed the presence of 2 known genera, *Bacillus* and *Thermobacillus* with the dominance of the genus *Bacillus*. As well as other genera whose tests are insufficient to determine them, representing in the form of cocci and coccobacilli.

La mise en évidence de la production de quatre enzymes (protéase, amylase, cellulase et pectinase) par des micro-organismes isolés à partir d'eau thermale et sol proche des sources thermales.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Générale

Dans le cadre de la recherche d'enzymes produites par des microorganismes extrêmophiles isolés depuis l'eau thermale et le sol avoisinant des sources thermales se trouvant à hammam, Debegh, Guelma, Algérie. Onze souches de moisissures, une levure et treize souches de bactéries ont été purifiées puis testées pour leur activité catalytique et finalement identifiées.

Les activités enzymatiques recherchées (protéolytiques, amylolytiques, cellulolytiques et pectinolytiques) chez les souches fongiques et bactériennes isolées sont testées sur un milieu spécifique pour chaque activité enzymatique. La totalité des souches fongiques et bactériennes présentent au moins une activité enzymatique. Ce qui permet la sélection de l'ensemble de ces souches pour leur identification.

Les résultats indiquent la richesse de l'échantillon prélevé de souches fongiques et bactériennes capables de produire d'importantes activités enzymatiques. En effet, l'eau thermale et le sol environnant ces sources chaudes sont une source potentielle d'enzymes pouvant être thermorésistantes et donc très intéressantes pour leurs applications industrielles.

L'étude macroscopique et microscopique des souches fongiques a montré que les onze souches de moisissures isolées, testées et sélectionnées représentent 5 genres (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium* et *Rhizoctonia*). Les genres les plus dominants sont *Aspergillus* et *Penicillium*.

La caractérisation phénétique réalisée pour les souches bactériennes a permis d'avoir accès à certaines propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques de ces microorganismes. Les résultats ont montrés la présence de deux genres connus, *Bacillus* et *Thermobacillus* avec la dominance du genre *Bacillus*. Ainsi que, d'autres genres dont les tests réalisés sont insuffisant pour les identifier.

Mots clés : Champignons, bactéries, protéase, amylase, cellulase, pectinase, eau thermale, sol**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Zoologie. Faculté S.N.V. U. C.1 ; E.H.S. C.

Jury d'évaluation :

Président du jury :	<i>ARABET</i>	<i>Dallel</i>	(M.C.B. - UFM Constantine),
Rapporteur :	<i>BENKAHOUL</i>	<i>Malika</i>	(M.C.B. - UFM Constantine),
Examineur :	<i>MILET</i>	<i>Asma</i>	(Dr. - UFM Constantine).

Date de soutenance : 27/06/2018