



جمهورية الجزائرية الديمقراطية ال
République Algérienne Démocratique
Populaire



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur
Et De La Recherche Scientifique
جامعة الإخوة منكوري قسنطينة 1
Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
كلية العلوم الطبيعية والحياة 1

Département : biologie appliquée

قسم : البيولوجيا التطبيقية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Biotechnologie et Biothérapie

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

***Essai d'isolement des bactéries thermophiles productrices
d'enzymes à partir d'une source thermale de l'Est Algérien.***

Présenté par :

- Abid Souha
- Mellaoui Aymen Abderhman
- Selmane Yassir Haithame

Jury d'évaluatin :

- **Président** : Dr. Benhamdi Asma (MCA-U.F.M ,Constantine 1)
- **Encadrant** : Dr. Adjerroud Moussa (MCA-U.F.M ,Constantine 1)
- **Examineur** : Dr. Milet Asma (MCB-U.F.M ,Constantine 1)

Année universitaire

2024 - 2025



REMERCEMENT

Avant tout, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à Allah, le Tout Puissant et le Miséricordieux , qui nous a donné la force, la vitalité et la résilience indispensables à la réalisation de ce mémoire.

*Nous souhaitons tout d'abord exprimer nos sincères remerciements à notre encadrant, **Mr Moussa Adjeroud** Maître de conférences à l'université Frère Mentouri, pour sa bienveillance, son encadrement, sa disponibilité ainsi que ses conseils avisés.*

*Nous tenons à remercier, **Madame Benhamdi Asma** , maitre de conférences à l'université Frère Mentouri de nous avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*Nous remercions également **Mme MILET Asma**, maitre de conférence à l'université Frère Mentouri d'avoir accepté d'examiner notre travail*

*Nous tenons aussi à remercier de tout cœur les ingénieurs du laboratoire de microbiologie générale à la faculté des sciences de la nature et de la vie pour leur précieuse collaboration et pour son soutien, Nos sincères remerciements vont également à l'ingénieur du Laboratoire de biochimie **Mme Zahraoui chafika** ,*

*Nous tenons à remercier le chef service de moyens et maintenance ,**Chabal ibrahim al khalil** .*

*Nous remercions également tous les enseignements du département plus précisément ceux de la spécialité biotechnologie et biothérapie pour la qualité de l'enseignement en occurrence **M.kacem Chaouche***

Dédicace

*TA Je dédie cet ouvrage **A mes parents** qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.*

***A mes frères, mes grands parents** et Ceux qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.*

***A ma famille**, mes proches et à ceux qui me donent encourage et de la vivacité. A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès*

HAITHAME



Dédicace

À mes chers parents,

À vous qui m'avez tout donné sans rien attendre en retour...

Votre amour, vos sacrifices, et vos prières ont été le socle de ma force et de ma persévérance.

Ce travail vous revient avant tout. Merci pour tout, du plus profond de mon cœur.

À mon frère Mohamed El Amine,

Merci pour ta présence constante, ton écoute patiente et ton soutien discret mais toujours là au bon moment.

Tu as été pour moi une épaule solide et une source de courage inestimable.

À mes sœurs,

Merci pour votre tendresse, votre complicité et votre soutien indéfectible.

Et tout particulièrement à Lyna, ta douceur, ta sensibilité et ta présence lumineuse ont toujours eu le pouvoir d'apaiser mes journées.

Tu occupes une place très spéciale dans mon cœur, et je te remercie d'être exactement telle que tu es.

À Randa, ma belle-sœur,

Merci pour ta douceur, ta bienveillance, et la lumière calme que tu apportes à notre famille.

Ton soutien a toujours été apprécié.

À mes chères amies,

Merci pour votre affection,

votre patience et votre présence à chaque étape.

souha



Dédicace

Je remercie tout d'abord, Allah, le tout puissant et clément de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Je dédie ensuite ce fameux travail aux plus exceptionnels qui existent dans le monde, mon encadreur Mr AdJeroud Moussa, qui méritent tous mon respect et tribut. À toute la famille Mellaoui sans exception.

À mes parents, qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études que Allah me les garde.

Je dédie également à tous ceux qui m'aiment et spécialement

à mes adorables frères et sœurs. Ma sœur : Ritadj

mon cher frère : Iyad à mes collègues dans ce

Travail : Souha et Haïthem.

Aymen



Liste des abréviations

GN : gélose nutritive

TSA : gélose trypto-caséine soja

MN : milieu naturel

G- : Gram négatif

G+ : Gram positif

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

°C : Degré Celsius

PH : potentiel hydrogène

ADN : acide désoxyribonucléique

SNP : l'identification des polymorphismes nucléotidiques simples

WGA : l'amplification de l'ensemble du génome

Liste des Tableaux :

Tableau 1: Critères de classification des eaux thermales selon leur concentration ionique (Schwenke, 2007).	4
Tableau 2: Comparaison entre enzyme mésophile et thermophile.	15
Tableau 3: Tableau de la lecture de galerie api 20E	30
Tableau 4 : Les résultats de la purification	35
Tableau 5 : Résultats de la coloration de Gram pour les souches bactériennes isolées.	37
Tableau 6 : Activité protéolytique observées chez les souches bactériennes isolées.	43
Tableau 7 : Résultats des tests lipolytiques enzymatiques des souches isolées	44
Tableau 8 : Résultats de la galerie API 20 E A température 50°C.	46
Tableau 9: Résultats de GALRIE API E a température 37°C	47

Liste des Figures :

Figure 1 : Hammam Debbagh de Guelma (Algérie).....	6
Figure 2 : Parc de Yellowstone, Etats-Unis	6
Figure 3 : Source d'eau chaude, Beppu, à la mer "Hell", Japon ; Source d'eau chaude.....	6
Figure 4 : Les fumerolles sulfureuses	8
Figure 5 : Solfatare en Islande.....	8
Figure 6 : Geyser Pohutu, Nouvelle-Zélande	8
Figure 7 : Geyser d'El Tatio, Chili	8
Figure 8 : Arbre phylogénique du vivant d'après Woese modifié d'après Stetter (2006) (Stetter, 2006) (Byrne, 2008).....	11
Figure 9 : Zone de prélèvement	23
Figure 10 : Situation géographique d'Oued El Athmania (Google Earth, 2025).	23
Figure 11 : PH mètre portable hanna (HI8424).	24
Figure 12 : Photo d'échantillon.	24
Figure 13 : Les milieux de culture utilisée (TSA et Gélose Nutritive)	25
Figure 14 : Photo de l'interface du logiciel UPBM LE LAB API.	29
Figure 15 : Ensemencement de l'eau sur milieux GN et TSA.....	31
Figure 16 : Photo des colonies isolées sur le milieu GN et TSA a température 50°C.	32
Figure 17 : Photo des colonies isolées sur le milieu GN et TSA a température 37° C.	33
Figure 18 : Photographies des souches isolées de la source thermale hammam grouze.	35
Figure 19 : Conservation sur les tubes incliné.....	36
Figure 20: Photographie générale montrant l'ensemble des lames colorées après coloration de Gram.....	36
Figure 21 : Aspects microscopique de souches sélectionnée, après observation à l'immersion (x100).	39
Figure 22 : Les résultats de test protéasique à température 37 °C.	41
Figure 23 : Le résultat du test protéolytique pour la première méthode à 50 °C.....	42
Figure 24 : Le résultat du test protéolytique pour la deuxième méthode.	43
Figure 25 : Résultats de tests lipolytiques.	44
Figure 26 : Galries api 20E appliquée sur le milieu GN ; TSA a température de 37°C et 50°C.	45
Figure 27 : GALRIE API 20E appliquée sur le milieu GN ;TSA a température de 37°C et 50°C sur site UMPG.....	49

Table des matières

REMERCEMENT

Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des Tableaux :	
Liste des Figures :	
Table des matières	
Introduction Générale	1
Chapitre 1 : Les environnements extrêmes	2
1. Les environnements extrêmes.....	2
1.1. Définitions des l'eaux thermales :	2
1.2. Origine des eaux thermales :.....	2
1.3. Classification des sources thermales :	3
1.3.1. Classification selon la température d'apparition :.....	3
1.3.2. Classification selon la prédominance ionique :.....	3
1.2.3. Le classement Classification en fonction de la conductivité :	4
1.2.4. Selon l'acidité ou la basicité :	5
1.4. Les sources thermales terrestres :.....	5
1.4.1. Fumeroles et solfatares terrestres :	7
1.4.2. Les geysers	8
1.5. La diversité microbienne des sources thermales	9
1.5.1. Les bacteries	9
1.5.2. Les Archées	9
1.5.3. Les algues	10
1.5.4. Eucarya.....	10
1.6. Paramètres physico-chimiques influençant la composition des communautés microbiennes thermophiles	11
1.6.1. Température :	11
1.6.2. Le PH :	11
1.6.3. La salinité :	12
1.7. Mécanismes de survie dans les environnements chauds.....	12
1.7.1. Les protéines :	12
1.7.2. Acide nucléique :	13
1.7.3. La membrane cytoplasmique :	13

2.1. Importance de bactérie thermophile en biotechnologie	14
2.2. Caractéristique spécifique des enzymes thermostables :	14
2.3. Comparaison avec les enzymes mésophiles	14
2.4. Interets industriels et scientifique :	15
2.5. Principales enzymes d'intérêt industriel :	16
2.5.1. Protéase thermostable :	16
2.5.2. Amylases	17
2.5.3. Cellulase :	17
2.5.4. Lipases thermophiles	18
2.5.5. Enzyme xylanases :	19
2.5.6. Adn polymérase :	19
2.6. Application biotechnologie des enzymes thermophiles :	20
2.6.1. Boulangerie :	20
2.6.2. Brasserie :	20
2.6.3. Production de sirops de glucose :	21
2.7. Application en bioremédiation et dépollution :	21
2.7.1. Traitement des hydrocarbures :	21
2.7.2. Gestion des déchets :	22
3.1. Description du site d'échantillonnage :	23
3.2.Échantillonnage	24
3.3. Isolement, purification et conservation des isolats :	24
3.3.1. Les milieux de cultures utilisés	25
3.4. Identification :	25
3.4.1. Etude Macroscopique :	25
3.4.2. Observation microscopique :	26
3.4.2.1. Coloration de gram :	26
3.2.2.2.Étapes de la coloration de Gram :	26
3.5. Mise en évidence des enzymes extracellulaires	27
3.5.1. Test de l'activité protéolytique (protéase).....	27
3.5.2. Test de l'activité lipolytique (lipase)	28
3.6. Caractérisation biochimique par la galerie Api 20 E :	28
3.7. La physico-chimie de la source thermique :	31
3.8. L'isolement :	31

3.9.Purification :	33
3.9.1.Tubes inclinés pour la conservation des souches :	36
3.10.Identification :	36
3.10.1.Identification macroscopique :	36
3.10.2. Identification microscopique	38
3.1.1.Mise en évidence des enzymes extracellulaires	40
3.1.1.1.Le test de protéasique (protéase)	40
3.1.1.2.Le test de l'activité lipolytique :	43
1.2. Résultats de la galerie plaque API 20E :	45
Références :	53
Annexe	57
Resume :	

Introduction

Introduction Générale

L'intérêt grandissant pour les micro-organismes thermophiles est dû à leur faculté de résister et de fonctionner dans des milieux à haute température, sans se dénaturer. Les enzymes qu'ils génèrent possèdent des caractéristiques remarquables, y compris une stabilité thermique exceptionnelle, une forte résistance à des agents chimiques hostiles et à des fluctuations extrêmes de pH, contrairement aux enzymes mésophiles. Ces attributs leur donnent une grande possibilité d'utilisation dans différents domaines industriels, comme la biotechnologie (Hussin et al., 2011).

On reconnaît aux sources chaudes d'être des milieux naturels favorables à la colonisation des thermophiles. Ces environnements diffèrent selon leurs attributs géologiques et leurs caractéristiques physico-chimiques, en particulier les gradients thermiques (Pandey et al., 2015).

L'Algérie détient un potentiel géothermique considérable, principalement situé dans la partie nord-est du pays, région où se trouvent la plupart de ces manifestations. On a dénombré plus de 240 sources thermales dans cette région, dont plusieurs affichent des températures élevées, parfois dépassant les 45 °C. Cette abondance de géothermie constitue un avantage naturel considérable pour la nation (Saibi, 2009).

L'objectif de cette étude est d'isoler des bactéries thermophiles productrices d'enzymes à partir de la source thermale de Hammam Grouz, dans la wilaya de Mila. Cela s'inscrit dans l'effort de mettre en valeur les microorganismes extrémophiles pour leurs usages possibles en biotechnologie et dans le secteur industriel. L'étude est structurée en quatre grandes parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique portant sur les micro-organismes thermophiles. Elle est divisée en deux chapitres le premier traite des environnements extrêmes où ces organismes se développent, tandis que le second explore leurs applications biotechnologiques et industrielles des bactéries thermophiles.
- La deuxième partie décrit la partie expérimentale dédiée à l'isolement, l'identification et la caractérisation des bactéries thermophiles.
- La troisième partie présente les résultats obtenus, suivis de leur interprétation et discussion scientifique.
- Une conclusion globale est présentée, accompagnée d'une réflexion sur des perspectives à venir.

Chapitre I :

Les environnements

extrêmes

Chapitre 1 : Les environnements extrêmes.**1. Les environnements extrêmes :****1.1. Définition des eaux thermales :**

L'eau thermale est une eau souterraine provenant de profondeurs importantes, naturellement réchauffée par le gradient géothermique de la Terre. Tout au long de son parcours vers la surface, elle passe par diverses strates géologiques, se charge en minéraux, oligoéléments et substances chimiques, et développe des propriétés physico-chimiques et biologiques particulières. Elle représente un véritable écosystème hébergeant des micro-organismes adaptés à des conditions extrêmes. Ces éléments sont cruciaux pour la dynamique biologique de l'eau et participent à ses vertus curatives. Ainsi, l'eau thermale se présente comme une ressource naturelle précieuse pour le domaine médical, tout en constituant un environnement vivant possédant un grand potentiel dans le secteur de la biotechnologie (Lebaron, 2020).

1.2. Origine des eaux thermales :

- ❖ **Eaux thermales superficielles**, dites « neptuniennes » Les eaux neptuniennes sont des eaux de surface issues des précipitations. En s'infiltrant dans la roche ou les sédiments, l'eau de pluie se charge en minéraux. Ces eaux thermales froides affichent une température comprise entre 7 et 15 °C. Elles sont donc majoritairement utilisées en usage interne pour des cures de boisson.
- ❖ **Eaux thermales profondes**, dites « plutoniennes » :
Les eaux plutoniennes résultent de la condensation des gaz magmatiques pendant leur ascension vers la surface terrestre. L'émergence des eaux profondes se produit généralement à une température variant de 30 à 50 °C, voire jusqu'à 80 °C. Ces sources d'eau chaude, également appelées « hyperthermales », sont plutôt recommandées pour les inhalations, les douches et les bains de courte durée (Lefebvre, 2021) .
- ❖ **Eaux thermales mixtes** :
Ces eaux thermales sont le produit de l'interaction entre les eaux superficielles et les eaux de profondeur. Ils ont une température équilibrée, située entre 25 et 34 °C, idéale pour des bains thermaux de longue durée (Lefebvre, 2021) .

1.3. Classification des sources thermales :

1.3.1. Classification selon la température d'apparition :

Une classification selon la température permet de distinguer différents types d'eaux :

- **Les eaux froides** : température inférieure à 20 °C
- **Les eaux tièdes, dites hypothermales** : température comprise de 20 à 35 °C.
- **Les eaux chaudes, dites mésothermales** : température comprise entre 35 °C et 45 °C.
- **Les eaux très chaudes, dites hyperthermales** : température supérieure à 45 °C (Pissochet, 2021).

1.3.2. Classification selon la prédominance ionique :

La classification repose sur la composition en minéraux typiques, c'est-à-dire sur l'existence et la magnitude de différents anions et cations, vu que les sels se dissocient complètement dans l'eau. Les eaux minérales sont initialement catégorisées selon la présence d'un anion « notable », soit par sa concentration, soit par ses propriétés chimiques. On procède ensuite à l'établissement de subdivisions au sein de ces divisions, en fonction des cations présents.

Une seconde classification peut également être utilisée : en effet, il est d'usage courant de séparer les eaux fortement minéralisées des eaux faiblement minéralisées, qui se caractérisent notamment par une résistivité (Sanders, 2006).

❖ **Les eaux bicarbonatées (Eaux carbogazeuses) :**

Sodiques, Calciques ou mixtes (Sodacalciques). Ces eaux contiennent une quantité excessive de dioxyde de carbone provenant des profondeurs et devraient avoir des vertus thérapeutiques (effets sur le système digestif, respiratoire et circulatoire) (Sanders, 2006) .

❖ **Les eaux sulfatées** : Les ions sulfates sont associés au calcium et au magnésium (en plus faible quantité). On distinguera les eaux sulfatées calciques, les eaux sulfatées sodiques et les eaux sulfatées mixtes (sodium et chlorure) (Schwenke, 2007).

❖ **Les eaux sulfurées** : Sodiques ou à dominance calcique. Ces eaux se distinguent par la présence d'hydrogène sulfuré et de sulfures acides. Au stade du griffon, une biomasse gélatineuse se développe, appelée « barégine » ou « glairine », qui donne à ces eaux une texture particulière favorisant la pratique du massage. (Sanders, 2006).

❖ **les eaux chlorurées** :

Sodiques fortes et froides ou sodiques faibles et chaudes Le constituant essentiel de ces eaux est le chlorure de sodium (Sanders, 2006).

❖ Eaux Ferrugineuses :

Eau riche en fer, bien qu'elle soit généralement associée à des bicarbonates ou des sulfates. On les recommande dans des situations d'anémies sidéropéniques et d'autres formes d'anémies. Parce que cette catégorie d'eau est perçue comme ayant des propriétés de reconstitution. L'utilisation des eaux ferrugineuses est recommandée pour l'obésité, les rhumatismes, les troubles hépatiques et biliaires, ainsi que pour certaines maladies de la peau et des anomalies dans le développement de l'enfant (Bekkouche, 2016).

Le Tableau 1, illustre les critères de classification des eaux thermales.

Tableau 1: Critères de classification des eaux thermales selon leur concentration ionique (Schwenke, 2007).

Concentration ionique	
Appellation	Critère
Sulfurée	Sulfures > 0,3mg/l
Sulfatée	Sulfates > 200mg/l
Chlorurée sodique	Chlorure > 250mg/l et Sodium > 200mg/L
Bicarbonatée gazeuse	Hydrogénocarbonate > 1g/l Et CO ₂ > 250mg/l
Ferrugineuse	Fer bivalent > 0,5 mg/l

1.2.3. Le classement Classification en fonction de la conductivité :

La conductivité électrique d'une eau, représentant la conductance du courant électrique, est directement liée à la température. Elle est également dépendante du nombre d'ions présents dans cette eau, ce qui en fait un indicateur clé pour évaluer sa minéralisation globale. Pour que toutes les valeurs soient comparables, il faut ajuster les mesures à une température standard de 20 °Selon Issaâdi (1992), les sources minérales et thermales de l'Algérie sont réparties en quatre catégories :

- Groupe 1 : la conductivité inférieure à 2000 µs/cm
- Groupe 2 : la conductivité située entre 2000 et 7000 µs/cm

– Catégorie 3 : la conductivité se situe entre 7500 et 15000 $\mu\text{S}/\text{cm}$

.– Groupe 4 : la conductivité excède 15000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Foued, 2018)

1.2.4. Selon l'acidité ou la basicité :

Le pH est un indicateur qui définit le caractère acide ou alcalin d'une eau. Les mesures du pH indiquent que toutes les sources thermales présentent des valeurs proches de la neutralité : de 6,3 à Hammam N'Bails comme seuil le plus bas, et jusqu'à 7,4 à Hammam El Chellal comme seuil le plus élevé.

1.4 .Les sources thermales terrestres :

Une source chaude est définie comme une source résultant de l'apparition d'eaux souterraines réchauffées par des processus géothermiques venant de la croûte terrestre. On retrouve les systèmes géothermiques dans divers environnements géologiques et leur existence n'est pas forcément associée au volcanisme. L'eau issue d'une source chaude est soit réchauffée par la chaleur géothermique, c'est-à-dire la chaleur générée à partir du sous-sol terrestre dans une région sans activité volcanique, soit en étant mise en contact avec du magma (roche fondue). Dans les régions sans activité volcanique, les eaux souterraines pénètrent profondément dans la croûte terrestre où elles rencontrent des roches qui se chauffent à cause du gradient géothermique. Dans les régions volcaniques, caractérisées par une activité tectonique, la proximité du magma génère un gradient thermique élevé qui peut réchauffer l'eau à un point où elle devient surchauffée. La pression se crée et contraint l'eau à remonter vers la surface de la Terre par les pores et les fissures de la croûte terrestre, où elle peut émaner sous forme de source chaude (sources thermales) ou de geysers. Lorsque le fluide chaud pénètre la surface terrestre, il provoque la dissolution de minéraux dans les régions voisines, entraînant ainsi une minéralisation significative. Les eaux thermales affichent généralement des concentrations élevées de plusieurs éléments et peuvent être fortement saturées en divers minéraux. Cela concerne généralement H, S, CO, des composés organiques de faible masse moléculaire, CH, H, NH et des oligo-éléments. (Satyanarayana et al., 2013).

De nombreux endroits à travers le monde abritent des systèmes thermiques terrestres, tels que l'Islande, le parc de Yellowstone aux États-Unis, la Nouvelle-Zélande et le Japon, figure 1. Leur contenu en minéraux, en nutriments et leur teneur en gaz varient grandement, avec un

pH qui fluctue de 1 à 10. Ainsi, les communautés microbiennes résidant dans ces zones thermiques, caractérisées par leurs conditions physiques et géochimiques variées, présentent également une grande diversité. Sur le territoire algérien, on compte plus de 240 sources thermales, qui sont géographiquement dispersées entre le Nord (notamment dans les zones de l'Oranie, de la Kabylie et du Constantinois) et le Sud (dans la région orientale du Sahara algérien). Les températures enregistrées à l'apparition fluctuent entre 22°C et 98°C. À Hammam Bouhnifia, dans l'Ouest, les températures atteignent 68°C, tandis qu'à Hammam El Bibans, au Centre, elles montent jusqu'à 80°C. Dans la région Est, à Hammam Maskoutaine, on enregistre même 98°C. Dans la zone méridionale, certaines sources thermales atteignent parfois plus de 50°C. (Belhaine and Latreche, 2016).

Voici quelques exemples sur les sources thermales au Japon, aux États-Unis et en Algérie :



Figure 2 : Parc de Yellowstone, États-Unis



Figure 1 : Hammam Debbagh de Guelma (Algérie)



Figure 3 : Source d'eau chaude, Beppu, à la mer "Hell", Japon ;

1.4.1. Fumeroles et solfatares terrestres :

Il est courant d'observer des zones de fissures, de bouches et d'évents émettant de la vapeur, du sulfure d'hydrogène, du dioxyde de carbone et divers autres gaz lors de l'exploration des régions volcaniques. On désigne généralement ces phénomènes sous le terme de « fumeroles ». Sur des volcans en activité, leur température peut fluctuer de 100 à 1 000 °C. Les gaz peuvent se déplacer à une vitesse dépassant 150 m.s⁻¹. En règle générale, les émissions ne renferment plus de gaz hautement corrosifs (HF, HCl) ; néanmoins, du SO₂ peut être présent en abondance dans certaines fumeroles. Il est possible que les volumes de gaz atteignent plusieurs milliards de mètres cubes. Lorsque l'hydrogène sulfuré (H₂S) s'oxyde partiellement avec l'O₂ de l'atmosphère, il se convertit en partie en vapeur de soufre, susceptible de se cristalliser en magnifiques formes près des événements. Les fumeroles sont principalement caractérisées par l'émission de gaz. Elles surviennent généralement en même temps que les éruptions volcaniques et subsistent assez longtemps après celles-ci. On identifie deux catégories de fumeroles :

- ❖ **Les fumeroles sèches** : dont la température varie entre 500°C et 1 000°C et qui sont abondantes en H₂, SO₂, F et Cl ;
- ❖ **Les fumeroles acides** : avec une température se situant entre 300°C et 500°C, riches en H₂O, CO₂, H₂, SO₂, H₂S et HCl (Detay and Thomas, 2013) .

Il faut distinguer les solfatares des fumerolles, car ils se caractérisent par leurs émissions de gaz soufre. Habituellement, les solfatares se trouvent dans des zones de solfatares qui englobent des sols, des eaux superficielles et des boues chauffées. Ces éléments sont le résultat d'activités volcaniques (chambres magmatiques) localisées sous ces zones. Bien que les champs de solfatares soient constamment des milieux chauds, avec des températures pouvant atteindre 100 °C et une forte teneur en soufre, leur composition chimique peut cependant varier considérablement et est influencée par la géologie locale. On les trouve principalement en Islande, en Italie et au parc de Yellowstone aux États-Unis (Thiroux, 2019). Des exemples sont illustrés dans les figures 4 et 5.



Figure 4 : Les fumerolles sulfureuses



Figure 5 : Solfatare en Islande

1.4.2. Les geysers

Les geysers sont des formations géologiques de taille réduite, composées de roches fissurées et poreuses capables de retenir de l'eau, qui produisent sporadiquement des jets d'eau et de vapeur à la surface des structures. On distingue deux catégories de geysers basées sur leur forme géométrique. Le premier type de geysers, dit de fontaine ou de bassin, correspond à des systèmes où l'eau chaude affleure en surface sur une relativement grande étendue et dont les éruptions sont violentes. Le second type fait référence à des geysers de colonne ou de cône qui possèdent une ouverture en surface relativement petite, généralement coiffée d'un petit monticule (Cros, 2011). Des exemples sont illustrés dans les figures 6 et 7.



Figure 7 : Geyser d'El Tatio, Chili



Figure 6 : Geyser Pohutu, Nouvelle-Zélande

1.5. La diversité microbienne des sources thermales

L'identification des procaryotes hyper thermophiles à la fin des années 1970 a coïncidé avec l'établissement du domaine *Archaea*, « le troisième domaine du vivant », grâce aux recherches novatrices de Karl Woese. Les microorganismes procaryotes hyper thermophiles et thermophiles, prélevés dans les zones géothermales terrestres et marines, appartiennent aux deux domaines que sont Bacteria et Archaea. Ces procaryotes présentent une grande variété de caractéristiques physiologiques et métaboliques (Maude, 2000).

1.5.1. Les bactéries

Plusieurs lignées de micro-organismes thermophiles appartenant au règne des Bacteria incluent des espèces mésophiles et thermophiles. Par ailleurs, trois lignées fondamentales (*Thermotogales*, *Thermodesulfobacterales* et *Aquificales*) ne comptent que des espèces thermophiles ou hyperthermophiles. Parmi les cyanobactéries, des espèces telles que *Chloroflexus* et *Synechococcus* se caractérisent par une phototrophie modérément thermophile. Des genres tels que *Thermoanaerobacterium*, *Caminicella* et *Tepidibacter* sont des bactéries anaérobies fermentaires au sein des Gram positives. Le groupe *Thermus-Deinococcus* comprend des chimioorganotrophes aérobies qui ont été isolés de milieux chauds. On a récemment découvert des espèces de la classe Epsilon des protéobactéries, telles que *Caminibacter*, dans des systèmes hydrothermaux en profondeur, qui utilisent le soufre, les nitrates ou l'oxygène. Les Thermotogales comprennent des espèces telles que *Thermotoga* et *Fervidobacterium*, qui prospèrent dans des environnements chauds ou pétroliers, avec une température idéale d'environ 80 °C. Ces organismes sont dotés d'une membrane qu'ils appellent « toga ». Le *Thermodesulfobacterium* et le *Thermodesulfatator* sont des sulfatoréducteurs thermophiles, capables de vivre à 70 °C. Les Aquificales, tels que l'Aquifex ou le *Desulfurobacterium*, sont les bactéries les plus thermophiles identifiées jusqu'à présent (atteignant 95 °C). Elles sont chimiolithoautotrophes et exploitent H₂, le soufre ainsi que des accepteurs comme O₂ ou NO₃⁻. De plus, elles font partie des rares organismes hyperthermophiles aérobies (Byrne, 2008).

1.5.2. Les Archées

Les deux principaux embranchements du domaine des Archaea, les Euryarchaeota et les Crenarchaeota, comprennent de nombreuses espèces qui sont thermophiles et hyperthermophiles. Dans le groupe des Crenarchaeota, les hyperthermophiles se situent à la racine de l'arbre phylogénétique et comprennent principalement des micro-organismes

chimiolithotrophes autotrophes, avec quelques espèces chimiorganotrophes. Les Euryarchaeota englobent une variété physiologique d'Archaea hyperthermophiles comme les *Methanoarchaea* qui génèrent du méthane et des espèces chimioorganotrophes. Trois autres embranchements prennent aussi place dans l'arbre des *Archaea* : l'embranchement des Korarchaeota qui rassemble un groupe de micro-organismes non cultivés, dont la position à la base de l'arbre des *Archaea* et leur découverte dans une source chaude du parc du Yellowstone suggèrent une nature thermophile. Il y a également les Nanoarchaea tels que le *Nanoarchaeum equitans* ainsi que les Thaumarchaea, récemment identifiés comme une lignée distincte englobant les Crenarchaeota mésophiles (Byrne, 2008).

1.5.3. Les algues

On a référencé des algues thermophiles, qui peuvent supporter des conditions extrêmes comme des températures, une lumière, un pH et une valeur nutritive extrêmes, dans des écosystèmes distincts à l'échelle mondiale. Les espèces d'algues thermophiles les plus couramment observées incluent *Mastigocladus laminosus*, *Galdieria sulphuraria*, *Cyanidium caldarium*, *Leptolyngbya*, *Arthonema* ainsi que les variétés de *Synechococcus* et *Thermosynechococcus*. Ces espèces possèdent des adaptations morphologiques et fonctionnelles aux températures élevées. Certaines de ces espèces disposent d'enzymes résistantes à la chaleur, alors que d'autres affichent une concentration en GC supérieure aux formes mésophiles d'algues (sadeepa et al., 2024) .

1.5.4. Eucarya

Dans le système des eucaryotes, on ne trouve pas d'organismes véritablement thermophiles au sens strict du terme, c'est-à-dire qui peuvent se développer de manière optimale à des températures atteignant ou dépassant les 60 °C. Pour illustrer, la levure *Candida thermophila* se développe de manière optimale à une température comprise entre 30 et 35 °C, sa croissance étant maximale à 51 °C. Ainsi, *AamoEchineba thermarum*, un type d'amibe, prospère particulièrement bien à 50 °C, ce qui en fait l'un des eucaryotes les plus résistants à la chaleur connus. Le ver *Alvinella pompejana*, qui a été trouvé sur les parois de cheminées hydrothermales en activité, a été vu près de zones où la température atteint 100 °C. Cela a d'abord suggéré une tolérance thermique hors du commun. Néanmoins, des tests réalisés en laboratoire ont démontré que cette espèce ne tolère pas des températures excédant

50 °C, au-delà desquelles ses tissus se détériorent rapidement. Donc, la température maximale connue à laquelle les eucaryotes peuvent survivre semble être d'environ 50 °C (Prieur, 2014).

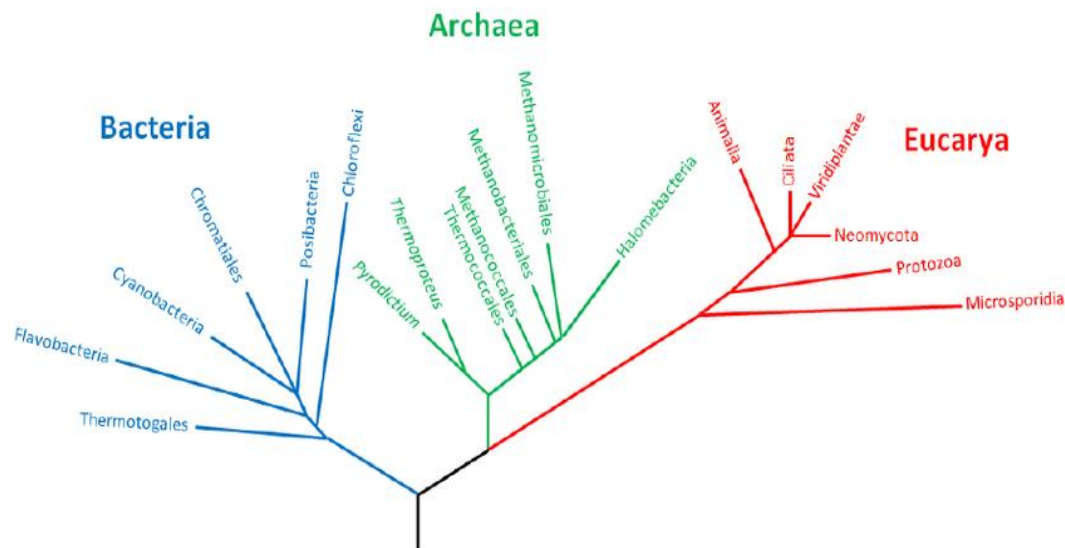


Figure 8 : Arbre phylogénétique du vivant d'après Woese modifié d'après Stetter (2006) (Stetter, 2006) (Byrne, 2008).

1.6. Paramètres physico-chimiques influençant la composition des communautés microbiennes thermophiles

1.6.1. Température :

Les bactéries thermophiles, qui sont des microbes capables de vivre et de survivre à des températures allant de 45 °C à 122 °C, constituent un élément crucial pour la croissance microbienne (Benzerfa et al., 2021).

1.6.2. Le PH :

Le développement des bactéries thermophiles est affecté par les fluctuations du pH, certaines d'entre elles prospérant dans une plage de pH avoisinant la neutralité, entre 6,5 et 7,4. La majorité des bactéries thermophiles se multiplient dans des milieux acides où le pH varie de 0 à 4, ainsi que dans des espaces alcalins où le pH dépasse 9. On les désigne respectivement comme étant des acidophiles et des alcalophiles (Benzerfa et al., 2021).

La croissance des bactéries thermophiles est affectée par les fluctuations du pH, certaines d'entre elles prospérant à un pH proche de la neutralité, soit entre 6,5 et 7,4. La majorité des bactéries thermophiles se multiplient dans des milieux acides où le pH varie de 0 à 4, ainsi que dans des espaces alcalins où le pH dépasse 9. On les nomme respectivement acidophiles et alcalophiles.(Laouamri, 2024).

1.6.3. La salinité :

C'est généralement du chlorure de sodium (NaCl) ou la concentration en sel qui influence la prolifération des bactéries (Benzerfa et al., 2021).

1.7. Mécanismes de survie dans les environnements chauds

Un certain nombre de mécanismes adaptatifs et/ou de molécules exclusifs aux thermophiles permettent la vie à des températures élevées. L'examen de biomolécules essentielles chez les bactéries thermophiles a mis en évidence des variations structurales discrètes au niveau des protéines, des acides nucléiques et des lipides (MAOUCHI and MEDJEDOUB, 2020).

1.7.1. Les protéines :

La stabilité des protéines chez les microorganismes thermophiles dépend de plusieurs facteurs, variant d'un microorganisme à l'autre. La constitution en acides aminés des protéines thermostables ne révèle pas de caractéristiques distinctives. Les enzymes traditionnelles perdent généralement leur activité au-delà de 60 °C, tandis qu'une grande partie des enzymes thermophiles demeure stable et fonctionnelle à des températures bien plus élevées. La déamination des chaînes latérales de l'asparagine et de la glutamine, ainsi que la rupture des ponts disulfures, se manifeste à des températures supérieures à 80 °C. Le processus de repliement des protéines est un élément crucial pour la thermostabilité. On a observé certaines caractéristiques partagées par les protéines thermostables :

- une faible exposition aux solvants
- un accroissement de l'hydrophobicité au centre de la protéine, ce qui réduit sans doute le danger de dépliement
- Un accroissement de la concentration de l'enzyme repliée, contribuant à réduire les cavités du centre hydrophobe.

- une réduction de la longueur des boucles superficielles
- la présence de liaisons hydrogène entre les résidus polaires et un nombre accru de liaisons ioniques en surface (Postic, 2005).

1.7.2. Acide nucléique :

Les nucléotides, qui contiennent des bases puriques (adénine, guanine) ou pyrimidiques (cytosine, thymine), composent les acides nucléiques. Car le lien entre la cytosine et la guanine est plus fort (trois liaisons hydrogène) que celui entre l'adénine et la thymine (deux liaisons), l'idée a longtemps prévalu qu'un taux élevé de GC garantissait une plus grande stabilité de l'ADN, surtout chez les organismes thermophiles. Cependant, plusieurs de ces entités n'affichent pas nécessairement un taux de GC supérieur à celui des mésophiles. Cela indique que la résistance de l'ADN face à la chaleur élevée dépend surtout de changements chimiques ou de structures stabilisatrices spécifiques (Vavitsas et al., 2022).

Les archées hyperthermophiles disposent d'une gyrase inversée, l'ADN topoisomérase de type I, qui génère des super-tours positifs dans l'ADN. Cela aide à raffermir la double hélice d'ADN et à la protéger contre la dénaturation thermique. On n'a identifié les gyrases inverses que chez les microorganismes qui prospèrent à des températures optimales supérieures à 65 °C, et elles sont systématiquement présentes chez les archées et les bactéries avec des températures optimales de croissance dépassant les 80 °C. Ce super-enroulement pourrait préserver les paramètres structuraux et thermodynamiques de l'ADN à des niveaux analogues à ceux des mésophiles (Postic, 2005).

1.7.3. La membrane cytoplasmique :

La membrane cytoplasmique des micro-organismes thermophiles doit aussi être résistante à la chaleur. En règle générale, la bicouche lipidique qui la compose se dénature sous l'effet de la chaleur. Dans les organismes thermophiles, ce processus est contrarié par la biosynthèse de membranes qui contiennent plus d'acides gras saturés et à chaîne linéaire, et moins d'acides gras insaturés. Les acides gras saturés créent un milieu plus hydrophobe que les acides gras insaturés, et les acides gras de longue chaîne présentent une température de fusion supérieure à celle des acides gras de courte chaîne. Dans l'ensemble, ces deux facteurs renforcent la stabilité de la membrane (Vavitsas et al., 2022).

Chapitre 2 :

Applications

biotechnologiques

Des bactéries thermophiles

2.1. Importance de bactérie thermophile en biotechnologie

Grâce à leur aptitude à vivre et opérer dans des conditions de chaleur élevée, les bactéries thermophiles sont essentielles en biotechnologie. Elles génèrent des enzymes résistantes à la chaleur qui demeurent efficaces en dépit de la chaleur, ce qui les rend d'une importance cruciale pour divers processus industriels. On utilise ces bactéries dans la gestion des résidus, la fabrication de biocarburants, l'assainissement des sols et des eaux polluées, ainsi que pour diverses applications dans le secteur agroalimentaire. Ils possèdent une résistance innée aux conditions extrêmes, ce qui diminue également les dangers de contamination, faisant d'eux des instruments efficaces pour l'élaboration de technologies écologiques, durables et rentables économiquement (Atalah et al., 2019).

2.2. Caractéristique spécifique des enzymes thermostables :

Les enzymes thermostables sont des enzymes qui peuvent résister à des températures hautes, atteignant jusqu'à 50 °C, sans que leur structure ou leurs propriétés spécifiques soient affectées. On a identifié leur capacité à améliorer le taux de conversion à haute température comme un élément crucial pour optimiser l'efficacité des opérations industrielles. L'un des avantages majeurs de l'utilisation d'enzymes thermostables pour réaliser des procédures à haute température est la réduction du risque de contamination microbienne. En outre, ces dernières participent à la diminution de la viscosité du substrat, à l'amélioration des vitesses de transfert et à l'accroissement de la solubilité lors des réactions. Les enzymes thermostables, telles que les cellulases et les xylanases, présentent un potentiel industriel important en tant que biocatalyseurs. Leur intérêt grandissant est surtout observé dans les domaines de la biodégradation et des biocarburants (Che Hussian and Leong, 2023).

2.3. Comparaison avec les enzymes mésophiles

Les enzymes générées par les micro-organismes mésophiles et thermophiles varient considérablement en termes de stabilité et de température optimale de fonctionnement. Spécifiquement, les enzymes produites par les organismes thermophiles et hyperthermophiles, nommées thermozymes, ont généralement une stabilité thermique élevée. Elles sont capables de résister à une inactivation irréversible à haute température et manifestent une performance optimale dans un intervalle de 60 à 125 °C, contrairement aux enzymes mésophiles qui

Chapitre 2 : Applications biotechnologiques des bactéries thermophiles

atteignent leur activité maximale entre 20 et 45 °C (Suresh et al., 2021) (Li et al., 2005) . Voir le **Tableau 2**.

Tableau 2: Comparaison entre enzyme mésophile et thermophile.

	Enzyme thermostable	Enzyme mésophile
Température	Élevé jusqu'à 120 °C	Entre 20 À 45 °C
Sources	Microorganisme thermophile Microorganisme extermophile	Microorganisme mésophile
Application	Industrie alimentaire, détergent, biocarburant	Application dans les procédés de conversion chimie-enzymes, application d'importance commerciale
Structure	Plus compacte, et les liaisons plus fortes	Plus stable que les thermophiles
Avantage	Résistance à la chaleur, vitesse de réaction élevée, plus de stabilité	Produire des enzymes thermostables par édition génétique, capable de survivre dans des conditions extrêmes

2.4. Intérêts industriels et scientifique :

Les enzymes générées par les bactéries thermophiles ont une importance primordiale en biotechnologie industrielle, grâce à leur performance optimale à des températures élevées. Ces enzymes, appelées thermozymes, offrent des substituts efficaces aux enzymes traditionnelles, notamment grâce à leur robustesse et leur performance dans des conditions environnementales sévères. Cela les rend particulièrement appropriées pour les processus industriels à haute température. Ces caractéristiques remarquables ont attiré l'attention grandissante des chercheurs et des professionnels de l'industrie, stimulant une recherche détaillée sur les micro-organismes aptes à survivre dans des conditions thermiques extrêmes. Cette revue souligne les nombreuses utilisations des bactéries thermophiles dans différents domaines industriels, comme :

Chapitre 2 : Applications biotechnologiques des bactéries thermophiles

l'industrie des enzymes, l'industrie pharmaceutique, la production de protéines unicellulaires, la bioconversion des déchets, l'exploitation pétrolière, la production de biocarburants (Kumar and Singh, 2011).

2.5. Principales enzymes d'intérêt industriel :

Les enzymes jouent un rôle crucial en tant que catalyseurs biologiques dans le domaine de la biotechnologie. Étant donné leur caractéristique unique et leur performance dans des conditions de température et de pH modérés, elles facilitent l'accélération de plusieurs réactions chimiques sans être épuisées. Grâce à leur forte activité catalytique et leur stabilité dans divers environnements, ils se présentent comme des instruments privilégiés pour les procédés biotechnologiques actuels. En outre, certaines enzymes ont la faculté d'agir sur divers substrats, étendant ainsi leur domaine d'application. On a identifié une vaste gamme d'enzymes d'intérêt industriel, chacune ayant un rôle crucial dans des secteurs technologiques particuliers (Katsimpouras and Stephanopoulos, 2021) .

2.5.1. Protéase thermostable :

➤ Utilisations en industrie agroalimentaire

Dans l'industrie agroalimentaire, les protéases sont cruciales, en particulier pour l'hydrolyse des protéines dans des processus comme le raffinement de la viande, la production de produits laitiers ou la préparation du pain. Cependant, l'efficacité des enzymes traditionnelles est restreinte par les conditions de chaleur extrême présentées dans certains processus industriels. L'emploi de protéases thermostables offre une solution à cette limitation en raison de leur aptitude à maintenir leur activité même à des températures élevées. Par exemple, une protéase dérivée de *Bacillus alcalophilus* a démontré une solide stabilité thermique, ce qui lui confère un avantage pour des processus tels que la pasteurisation ou l'extrusion. Ces enzymes aident donc à améliorer les performances industrielles, à diminuer les dépenses et à perfectionner les propriétés sensorielles des aliments hautement protéinés (Zhao and Liu, 2024).

➤ Utilisations pharmaceutiques :

L'intérêt pour les protéases thermostables grandit dans le domaine pharmaceutique grâce à leur aptitude à maintenir leur activité en présence de conditions extrêmes de température et de pH. Ces dernières, notamment générées par des bactéries telles que *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*, sont mises en œuvre dans la conception de systèmes d'administration de médicaments, spécifiquement ceux visant des protéines précises pour des traitements

Chapitre 2 : Applications biotechnologiques des bactéries thermophiles

anticancer ou thrombolytiques. Elles interviennent aussi dans la gestion des blessures chroniques sous forme de gels ou d'onguents, stimulant la réparation des tissus grâce à leurs vertus anti-inflammatoires modérées. Dans leur forme orale, leur encapsulation résistante à l'acide permet de maintenir leur activité enzymatique jusqu'à l'intestin, favorisant ainsi la digestion des protéines et l'assimilation des acides aminés. En outre, les protéases peuvent servir de biomarqueurs pour une détection précoce du cancer. Certaines recherches indiquent qu'elles améliorent l'efficacité des antibiotiques face aux biofilms pathogènes, ce qui fait d'elles des instruments prometteurs pour l'élaboration de thérapies novatrices (Ananta, 2024).

2.5.2. Amylases

➤ Textile

Dans l'industrie du textile, les amylases sont couramment employées lors du processus de désencollage, une phase essentielle du finissage. L'amidon, habituellement utilisé comme substrat d'encollage pour solidifier les fils pendant la phase de tissage, est par la suite retiré par méthode humide. Ces enzymes décomposent précisément l'amidon sans nuire aux fibres textiles et sont prisées pour leur performance et leur spécificité (de Souza and de Oliveira Magalhães, 2010).

➤ Application en bioénergie

-Production d'alcool carburant :

Le biocarburant liquide le plus couramment utilisé est l'éthanol. L'amidon, grâce à son coût abordable et à sa disponibilité comme matière première dans la majorité des régions du globe, est le substrat le plus couramment utilisé pour la production d'éthanol. Dans ce processus, l'amidon est d'abord mis en solution, puis il est soumis à deux phases enzymatiques pour obtenir des sucres pouvant être fermentés. Le processus de transformation de l'amidon en éthanol passe par la liquéfaction et la saccharification, étapes durant lesquelles l'amidon est transformé en sucre grâce à un micro-organisme amylolytique ou à des enzymes comme l'α-amylase. Cela est suivi d'une fermentation où le sucre se transforme en éthanol grâce à un agent microbien capable de fermenter, tel que la levure *Saccharomyces cerevisiae* (de Souza and de Oliveira Magalhães, 2010) .

2.5.3. Cellulase :

➤ Textile

Les cellulases, largement employées dans le processus de finition humide des textiles, sont particulièrement utilisées pour les tissus à base de cellulose afin d'améliorer leur texture et

Chapitre 2 : Applications biotechnologiques des bactéries thermophiles

leur apparence. Elles sont principalement utilisées pour le biostoning des jeans et le bio polissage du coton. Lors du biostoning, les extrémités des fibres en surface sont détachées, ce qui facilite l'élimination de la couleur par abrasion mécanique. Cette méthode, qui remplace l'utilisation de la pierre ponce, minimise les dégâts aux fibres et est plus écologique.

Le bio polissage, habituellement incorporé aux phases de traitement humide (désencollage, dégraissage, blanchiment, teinture, finition), favorise le lissage du tissu, réduit le boulochage et enhance la douceur, la luminosité des couleurs et la capacité d'absorption de l'humidité. Les cellulases à forte concentration en endoglucanases sont particulièrement performantes pour ces usages, car elles suppriment les microfibrilles superficielles qui confèrent un aspect fade et pelucheux aux tissus après de multiples lavages (Sharada et al., 2014).

➤ Application en bioénergie :

- Gestion des déchets:

La biomasse est le seul moyen énergétique primaire domestique, durable et renouvelable qui peut produire des combustibles liquides pour les transports. Depuis longtemps, la transformation des déchets cellulotiques en produits dérivés bénéfiques est considérée comme une démarche souhaitable. L'élimination des déchets solides municipaux de type cellulotique par des méthodes qui favorisent également la production d'énergie est d'un intérêt spécifique. Il y aurait des bénéfices doubles : d'une part, il y aurait une diminution de la quantité de déchets cellulotiques et de leurs impacts environnementaux ; d'autre part, le polluant serait transformé en une source d'énergie alternative, participant ainsi à la réduction de notre dépendance grandissante aux énergies fossiles (Sharada et al., 2014).

-Production de bioéthanol :

Le bioéthanol est fabriqué à partir de biomasse grâce à l'hydrolyse enzymatique de la cellulose, qui se transforme en sucres pouvant être fermentés. Ce processus fait appel aux cellulases, des enzymes modulaires qui fractionnent la cellulose indissoluble en oligosaccharides solubles, et ensuite en glucose. Par la suite, ce glucose peut être fermenté par des micro-organismes pour produire de l'éthanol. Le rendement final de production de bioéthanol (Ranganathan et al., 2022).

2.5.4. Lipases thermophiles

➤ Industrie cosmétique :

Aujourd'hui, les lipases sont reconnues comme l'une des enzymes les plus cruciales pour les applications dans le domaine de la biotechnologie. Dans le secteur cosmétique, elles ont une

Chapitre 2 : Applications biotechnologiques des bactéries thermophiles

double fonction : d'un côté, elles servent d'ingrédients actifs dans les formulations dites « fonctionnelles », aidant à maîtriser la production de sébum et à améliorer la texture cutanée ; de l'autre, elles sont employées comme biocatalyseurs pour la synthèse de divers composés spécifiques tels que des esters, des arômes et des agents actifs. Ces applications servent à améliorer les caractéristiques sensorielles et la biodisponibilité des produits (Schumr and Thum, 2013).

➤ Biodégradation des graisses :

Les lipases se distinguent par leur mécanisme d'action spécifique et leur sélectivité de substrat en tant qu'enzymes particulières. En fonction de leur environnement microscopique, elles peuvent se comporter comme des hydrolases dans un contexte aqueux, décomposant les triglycérides en acides gras et en glycérol, ou comme des catalyseurs dans le domaine de la synthèse organique, contribuant à des réactions telles que l'estérification, l'alcoololyse ou l'acidolyse. Les lipases, grâce à leur capacité d'adaptation, possèdent une régio- énantio- et chimios électivité marquée, ce qui les rend particulièrement attrayantes pour les usages industriels. En plus des triglycérides, certaines lipases ont la faculté d'hydrolyser des phospholipides, des esters de cholestérol et même certains esters synthétiques. Sur le plan phylogénétique, les lipases représentent une famille d'enzymes variées, provenant d'origines animale, végétale ou microbienne, ce qui amplifie grandement leurs possibilités d'application (Fickers et al., 2008).

2.5.5. Enzyme xylanases :

La xylanase est une enzyme hydrolytique qui favorise la rupture des liaisons glycosidiques β -1,4 du squelette du xylane, un élément principal de l'hémicellulose retrouvé dans les parois cellulaires des végétaux. Elle attire de plus en plus d'attention grâce à ses multiples applications industrielles, particulièrement dans les domaines du papier et de la pâte à papier, de la boulangerie, de la fabrication de biocarburants et de l'industrie agroalimentaire. Des études ont démontré que des micro-organismes comme *Bacillus subtilis*, *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger* et *Trichoderma viride* peuvent générer cette enzyme en grandes quantités lorsqu'ils sont cultivés dans des conditions de culture favorables (Liu and Kokare, 2017) .

2.5.6. Adn polymérase :

Le processus biologique essentiel de répllication exacte de l'ADN parental est préservé dans toutes les espèces vivantes. L'ADN polymérase est essentiel pour tous les organismes,

Chapitre 2 : Applications biotechnologiques des bactéries thermophiles

car elle est indispensable à la réplication et à l'entretien de leur génome. Les ADN polymérases occupent aussi une place importante en biologie moléculaire et en biotechnologie contemporaine, facilitant des méthodes telles que le clonage de l'ADN, la réaction en chaîne par polymérase (PCR), le séquençage de l'ADN, l'identification des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP), l'amplification de l'ensemble du génome (WGA), la biologie synthétique et le diagnostic au niveau moléculaire. Toutes ces applications s'appuient sur la compétence des polymérases à répliquer l'ADN, générant ainsi un produit qui reflète fidèlement l'entrée de départ (Gardner and Kelman, 2014).

2.6. Application biotechnologie des enzymes thermophiles :

Grâce à leur aptitude à supporter une vaste gamme de températures extrêmes, les enzymes générées par les bactéries thermophiles ont un potentiel considérable dans le domaine de la biotechnologie industrielle.

2.6.1. Boulangerie :

Parmi les nombreuses applications agroalimentaires des enzymes thermophiles, la boulangerie constitue un domaine clé où l' α -amylase thermostable joue un rôle essentiel dans l'amélioration de la qualité du pain. Cette enzyme est intégrée à la pâte du pain pour transformer l'amidon de la farine en dextrines plus petites, qui seront par la suite soumises à une fermentation par les levures. Cette opération accélère le processus de fermentation et diminue la viscosité de la pâte, ce qui optimise sa texture et sa consistance. En outre, la génération de sucres simples tels que le glucose et le maltose enrichit le goût, colore la croûte et améliore les caractéristiques du grillage. L'activité enzymatique a également une fonction anti-raisinant, contribuant à un cœur plus tendre et améliorant la durée de conservation des produits finis. Actuellement, des variantes thermostables de cette enzyme, notamment ceux issus de *Bacillus stearothermophilus*, sont commercialisés et fréquemment employés dans les compositions utilisées pour l'industrie de la boulangerie (Guerrand, 2017) .

2.6.2. Brasserie :

Grâce à leur aptitude à générer des enzymes thermostables, les bactéries thermophiles occupent une place significative dans l'industrie de la brasserie. Des enzymes comme l' α -amylase, la β -amylase, la protéase et la β -glucanase jouent un rôle dans diverses phases du processus de brassage, y compris la transformation de l'amidon en sucre, la décomposition des protéines et l'éclaircissement du moût. Des espèces thermophiles telles que *Bacillus*

Chapitre 2 : Applications biotechnologiques des bactéries thermophiles

licheniformis, *Geobacillus stearothermophilus* et *Thermus thermophilus* sont aptes à générer ces enzymes actives sous haute température, ce qui les rend particulièrement appropriées aux conditions thermiques du procédé de brassage. L'emploi de ces enzymes résistantes à la chaleur contribue à accroître l'efficacité du processus enzymatique, à optimiser la production de sucres fermentescibles, à diminuer la viscosité du moût et à produire une bière plus claire et plus stable (Gomaa, 2018) .

2.6.3. Production de sirops de glucose :

La majorité des méthodes industrielles de transformation de l'amidon se basent sur son hydrolyse enzymatique, produisant des sirops de glucose qui sont par la suite utilisés comme substrats fermentaires pour générer des produits chimiques comme l'éthanol, la lysine et l'acide citrique. Cette hydrolyse s'effectue fréquemment grâce à un mélange d'enzymes, en particulier la pullulanase et la glucoamylase, pour garantir une décomposition intégrale de l'amidon. Cependant, les enzymes couramment employées dans ces processus, comme la pullulanase, l'isoamylase, la β -amylase et la glucoamylase, sont généralement mésophiles et affichent une stabilité thermique restreinte, surtout quand la température dépasse les 60 °C. Cette faible résistance à la chaleur limite son utilisation dans les processus industriels à haute température, ce qui explique l'attrait grandissant pour les enzymes thermostables dérivées de micro-organismes thermophiles (Janevski et al., 2014).

2.7. Application en bioremédiation et dépollution :

2.7.1. Traitement des hydrocarbures :

L'efficacité de la bioremédiation concernant la pollution par les hydrocarbures dans les milieux terrestres et aquatiques dépend de la performance de microorganismes, en particulier des bactéries thermophiles, qui sont capables de décomposer ces contaminants même dans des conditions environnementales adverses comme des températures élevées ou des environnements peu accueillants. *Geobacillus thermoleovorans* est un exemple emblématique ; il s'agit d'une bactérie thermophile qui peut survivre à des températures dépassant les 60 °C et produit des enzymes thermostables, dont des lipases, qui sont indispensables pour la décomposition des hydrocarbures complexes dans les sols contaminés. En outre, ces bactéries ont la capacité de générer des biosurfactants qui fonctionnent comme des agents de solubilisation, favorisant l'amélioration de la biodisponibilité et de la décomposition des hydrocarbures. Par conséquent, l'utilisation de la bioremédiation assistée par la chaleur représente une approche prometteuse pour la décontamination des sols et des environnements

Chapitre 2 : Applications biotechnologiques des bactéries thermophiles

affectés par les hydrocarbures. Les procédés optimisés à haute température sont particulièrement adaptés aux rejets industriels émis entre 50 et 130 °C et aux sols pollués excavés, traités dans des réacteurs à boues, ce qui favorise une biodégradation accélérée et étend l'efficacité des technologies de dépollution. (Perfumo et al., 2006).

2.7.2. Gestion des déchets :

En général, les déchets, qui sont riches en composés organiques comme les glucides, les lipides et les protéines, constituent une proportion significative des résidus domestiques et industriels. L'accumulation de ces derniers représente un enjeu environnemental substantiel, tout en étant une ressource potentielle pour la valorisation biologique. L'emploi d'enzymes hydrolytiques, notamment celles dérivées de micro-organismes thermophiles, propose une solution prometteuse pour la biodégradation et la conversion efficace de ces résidus. Les α -amylases thermophiles, par leur aptitude à hydrolyser les polysaccharides complexes à des températures élevées, se démarquent parmi ces enzymes. Cette caractéristique favorise une meilleure solubilité des substrats et accélère les réactions enzymatiques. Ces caractéristiques thermotolérantes de l' α -amylase les rendent particulièrement appropriées pour les processus de traitement des déchets dans des conditions extrêmes, où les enzymes mésophiles traditionnelles perdent leur efficacité (Msarah et al., 2020).

Chapitre 3 :
Matériels
Et
Méthodes

Le présent travail a été réalisé durant la période de Février à Mai 2024 au niveau du laboratoire pédagogique de Microbiologie générale au sein de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Constantine 1

3.1. Description du site d'échantillonnage :

La station thermale de Hammam Grouz, est une source thermale majeure du nord-est de l'Algérie. Elle se trouve à environ 45 km au sud-ouest de la ville de Mila.

Cette source, utilisée depuis époque romaine, est reconnue pour ses propriétés curatives et son importance historique.

Elle se trouve géologiquement dans une zone tectoniquement active, abondante en minéraux ferreux, ce qui confère à ses eaux une teinte rougeâtre due à la grande concentration de fer et au dépôt d'oxydes autour des zones de source. Elle est située à la daïra de Oued Athmania figure 9 et 10.



Figure 9 : Zone de prélèvement

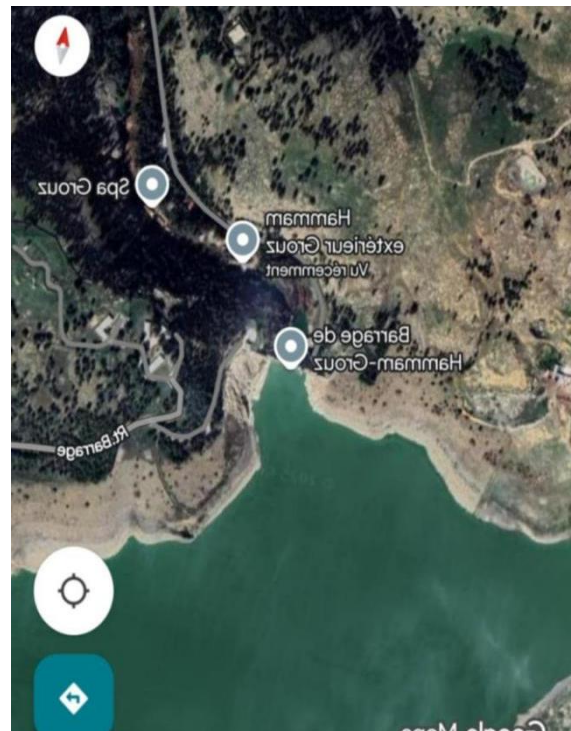


Figure 10 : Situation géographique d'Oued El Athmania (Google Earth, 2025).

3.2.Échantillonnage

Entre mars et mai 2025, des échantillons d'eau ont été collectés à partir d'une seule source thermale située à Hammam Grouz (Oued Athmania). On a appliqué la méthode de collecte manuelle, qui consiste à plonger directement le récipient de prélèvement jusqu'à une profondeur de 15 cm au-dessus du niveau de la surface (**figure12**). Des mesures directes de la température et du pH ont été réalisées à l'aide d'un pH-mètre portable HANNA (HI8424) (**figure 11**). Les échantillons ont été acheminés dans une glacière maintenue à 4 °C. Toutes les expérimentations ont eu lieu dans le laboratoire pédagogique de microbiologie de la faculté des Sciences naturelles et de la Vie à l'université Mentouri-Constantine 1.



Figure 11 : PH mètre portable hanna (HI8424).



Figure 12 : Photo d'échantillon.

3.3. Isolement, purification et conservation des isolats :

L'isolement des souches a été effectué sur deux milieux de culture différents. GN, le milieu TSA. Les milieux GN et TSA sont des milieux non sélectifs.

L'incubation est faite à 37°C, et 50 C° L'isolement est effectué par étalement de 0,1 ml de l'échantillon dans les boîtes de pétri. L'incubation des boîtes de Pétri a lieu pendant 24 heures à 48 heures. De chaque milieu quelques colonies d'aspect différent ont été prélevées et

purifiées par repiquages successifs sur les mêmes milieux solides. Les souches pures sont conservées à 4°C.

3.3.1. Les milieux de cultures utilisés

- **Milieu GN** : La gélose nutritive est un milieu de culture solide et milieu de culture microbienne très favorable à la croissance bactérienne, Le pH de la GN est de 7,2.
- **Le milieu TSA : (Tryptic Soy Agar)** est un milieu de culture solide nutritif largement utilisé en microbiologie pour la culture générale de bactéries et certains champignons. C'est un milieu **polyvalent**, non sélectif et non différentiel. (**Figure 13**).



Figure 13 : Les milieux de culture utilisée (TSA et Gélose Nutritive)

3.4. Identification :

3.4.1. Etude Macroscopique :

L'observation des colonies à l'échelle macroscopique permet de réaliser une première caractérisation, avec une possibilité d'orienter les résultats lors du processus d'identification. Thomas et ses collaborateurs (1970). Les Paramètres d'identification sont :

- La taille de colonies (*Petite, moyenne, grande*).
- La Forme (*Circulaire, irrégulière, filamentaire, rhizomorphe...*).
- Elévation (*Plate, bombée...*).

- Couleur de la colonie (*Blanche, crème, jaune, rose, rouge...*).
- Aspect de surface (*Lisse, rugueuse, brillante, mate, muqueuse, sèche...*).
- Transparence (*Transparente, translucide, opaque*).

3.4.2. Observation microscopique :

3.4.2.1. Coloration de gram :

La méthode de coloration Gram est une technique de coloration différentielle la plus couramment utilisée en microbiologie. Elle offre la possibilité d'identifier les bactéries contenues dans un échantillon selon leurs formes (en paires, en groupes, en chaînes...) et leur faculté à réagir en présence de colorants. Cette technique de coloration permet une caractérisation précise des bactéries en les classifiant selon leur réaction à la coloration de Gram positif ou à Gram négatif, ainsi qu'en bacilles ou en Coques selon leur morphologie.

3.2.2.2. Étapes de la coloration de Gram :

- **1) Préparation du frottis :**

Un échantillon de suspension bactérienne a été prélevé avec une pipette Pasteur et déposé sur une lame porte-objet propre. La goutte a ensuite été répartie de manière homogène sur l'ensemble de la surface de la lame, soit par des gestes circulaires, soit par des mouvements d'avant en arrière.

- **2) la fixation :**

La lame, une fois séchée à l'air libre, a été manipulée avec une pince stérile et exposée plusieurs fois à la flamme bleue d'un bec Bunsen. Cette phase de flambage a servi à fixer le frottis bactérien sur la lamelle.

- **3) Coloration primaire :**

Sur frottis fixé, la lame a été recouverte de violet de Gentiane pendant 1 minute. Ensuite le violet de Gentiane a été lavé à l'eau distillée stérile.

- **4) Mordançage :**

La lame a été recouverte de Lugol pendant 1 minute. Ensuite la lame a été lavée à l'eau distillée.

- **5) Décoloration :**

La lame a été décolorée à l'alcool jusqu'à ce qu'elle devienne claire. Puis rincée avec de l'eau distillée.

- **6) Contre-coloration :**

La lame a été recouverte de Fuchsin pendant 30 secondes à 1 minute. Ensuite lavée à l'eau distillée et séchée en utilisant papier absorbant. L'observation a été effectuée en plaçant une goutte d'huile d'immersion sur le frottis, avec un objectif x100. Par conséquent, les bactéries Gram-positives seront visibles en violet tandis que les bactéries Gram-négatives se présenteront en rose/rouge.

3.5. Mise en évidence des enzymes extracellulaires

3.5.1. Test de l'activité protéolytique (protéase)

- **Principe :** Ce test sert à identifier la production de protéases effectuée par les bactéries. Ces enzymes décomposent la caséine contenue dans le lait.

L'activité protéasique se manifeste par une zone dégagée entourant la colonie, signalant la décomposition de la protéine.

- **Méthode :** Nous avons utilisé 2 méthodes

➤ **Première méthode**

L'activité protéasique a été évaluée à l'aide d'un milieu solide à base de lait écrémé liquide et d'agar. Pour cela, 15 g d'agar ont été dissous dans 100 ml d'eau distillée, puis stérilisés à 121 °C pendant 15 minutes. En parallèle, 100 ml de lait écrémé liquide ont été stérilisés séparément à 115 °C pendant 15 minutes. Après refroidissement des deux solutions à environ 45 °C, elles ont été mélangées de façon aseptique, puis coulées dans des boîtes de Pétri stériles. Une fois le milieu solidifié, les souches bactériennes ont été ensemencées en quatre points sur la surface de chaque boîte. Les boîtes ont ensuite été incubées à deux températures (37 °C et 50 °C) pendant 24 h à 48 h (Delarras, 2007).

➤ **Deuxième méthode :**

Pour l'activité protéasique, deux milieux de culture ont été préparés : 100 ml de gélose nutritive (GN) et 100 ml de tryptic soy agar (TSA). Après stérilisation des milieux à 121°C pendant 20 minutes, ceux-ci ont été laissés à refroidir à environ 45–50°C. À ce stade, 02 mL de lait écrémé liquide stérilisé ont été ajoutés à chaque milieu. Le mélange a été homogénéisé délicatement, puis versé dans des boîtes de Pétri stériles (15–20 mL/boîte). Après solidification, les souches bactériennes ont été déposées en surface sous forme de 4 points distincts par boîte. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C et 50 °C pendant 24 à 48 heures.

L'apparition d'un halo clair autour des colonies indique une hydrolyse de la caséine, témoignant de la production de protéases par la souche testée (Ulucay et al., 2022).

3.5.2. Test de l'activité lipolytique (lipase)

❖ Principe

Ce test se base sur l'emploi de composés comme le Tween 20 et le Tween 80 en tant que substrats lipidiques. Quand une souche génère des enzymes lipolytiques qui hydrolysent les liaisons ester des Tween, entraînant ainsi la libération d'acides gras. Ces acides gras, en interagissant avec les ions présents dans l'environnement, créent des zones opaques ou irisées perceptibles autour des colonies. La présence de ces halos sert d'indicateur visuel de l'activité lipasique. Cette technique offre donc une sélection primaire aisée et efficace des micro-organismes susceptibles de générer des lipases. Cette technique offre donc une sélection primaire aisée et efficace des micro-organismes susceptibles de générer des lipases (Samad et al., 1989).

❖ Méthode

Une gélose nutritive (GN) stérile a été préparée en amont dans un flacon de 200 ml, puis séparée en deux portions de 100 ml. Pour la première, nous avons ajouté 2 ml de Tween 20, et pour la seconde, 2 ml de Tween 80, dans le but de créer deux milieux séparés pour évaluer l'activité lipolytique. Suite à l'homogénéisation, les milieux ont été répartis dans des boîtes de Pétri aseptisées. L'ensemencement a été effectué par la déposition de quatre gouttes de la culture bactérienne sur chaque boîte (technique de semis en spot). Les boîtes ont par la suite été placées en incubation à une température de 37°C et 50°C pour une durée de 24 à 48 heures (Ulucay et al., 2022).

3.6. Caractérisation biochimique par la galerie Api 20 E :

La galerie API 20E est un système biochimique standardisé développé par la société française bio Mérieux pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif non exigeants.

❖ Principe :

La galerie API 20E se compose d'une bandelette en plastique qui comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Chaque microtube est associé à un test biochimique précis pour examiner des activités enzymatiques ou des aptitudes métaboliques spécifiques des bactéries.

1. Préparation de la galerie :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

2. Préparation de l'inoculum :

- Ouvrir une ampoule de suspension medium (ou un tube d'eau distillée stérile). Prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé.
- Réaliser une suspension bactérienne faible (opacité 0,5 sur l'échelle Mc Ferland)

3. Inoculation de la galerie :























- Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne pour les autres tests, remplir uniquement les tubes. Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H2SH2S en remplissant leur cupule d'huile de vaseline. La lecture de la galerie est récapitulée dans le tableau 3, ci-dessous.

Il est important de mentionner que la lecture de notre galerie api 20^E est essentielle. Nous avons utilisé un logiciel nommé UPBM api le lab, dont l'adresse est la suivante : (<https://lab.upbm.org/>). C'est un programme informatique Pratique pour la consultation de la galerie API 20^E, car il facilite l'identification précise du microorganisme ainsi que le pourcentage correspondant (**Figure 14**).



Figure 14 : Photo de l'interface du logiciel UPBM LE LAB API.

Tableau 3:Tableau de la lecture de galerie api 20E

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E						
Microtube	Substrat :	Caractère recherché	Révélateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Béta galactosidase		Lecture directe		
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase	Rouge de phénol	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Fe III	Lecture directe		
URÉ	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		Lecture indirecte		
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		Lecture indirecte		
VP	Pyruvate de sodium	production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)		Lecture indirecte		
GEL	Gélatine	gélatinase	Particules de charbon	Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO ₂ ⁻/N ₂	Nitrates (NO ₃ ⁻)	Nitrate réductase		Lecture indirecte		

Résultats et discussions

3.7. La physico-chimie de la source thermique :

La source thermique de Hammam Grouz, localisée dans la zone d'Oued Athmania (Mila), est réputée pour sa température relativement faible, se situant autour de 35 °C. Cette température est nettement plus élevée que celle généralement observée dans les nappes phréatiques peu profondes à cette altitude, ce qui justifie son appellation de source thermique. Il est probable que ce réchauffement soit associé à l'existence de courants géothermiques souterrains, qui transfèrent leur chaleur à l'eau lorsqu'elle traverse les strates rocheuses en profondeur. L'apparition de cette eau à la surface est déterminée par la composition géologique et les conditions hydrogéologiques spécifiques à la région (Kresic, 2010).

pH : 7,82 mesuré à l'aide d'un pH-mètre portable.

3.8. L'isolement :

Nous avons choisi la source thermique d'Oued Athmania (Grouz), vu qu'elle n'a pas fait l'objet d'études microbiologiques antérieures. Les étapes d'ensemencement sur les différents milieux sont illustrées en (figure 15).

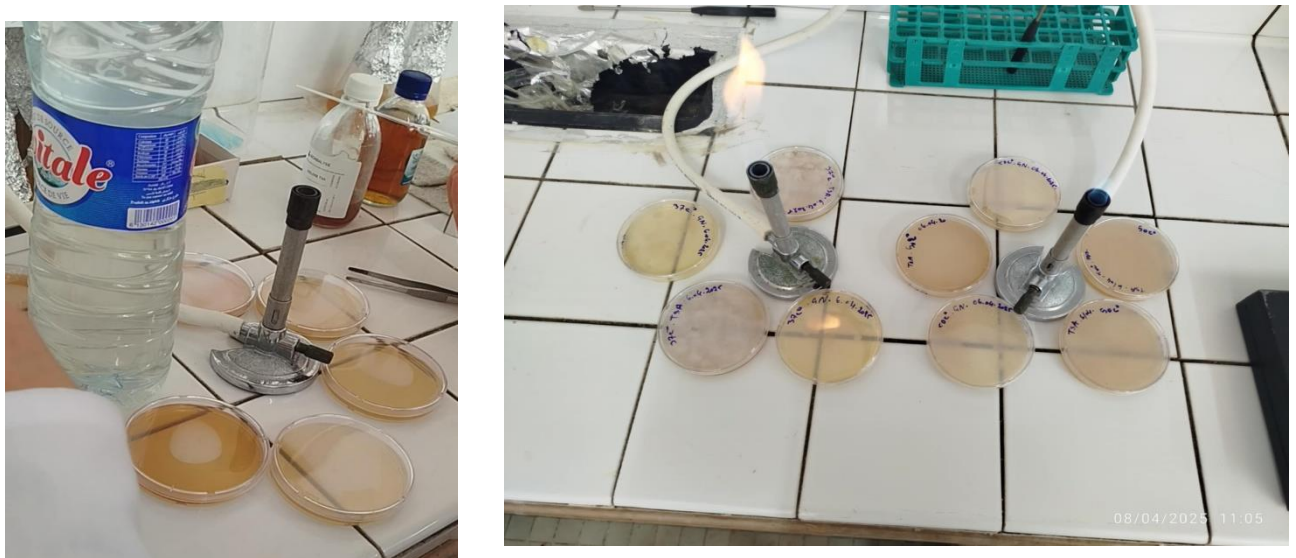


Figure 15 : Ensemencement de l'eau sur milieux GN et TSA.

Les résultats de l'isolement des colonies bactériennes contenues dans notre échantillon d'eau thermale sur les milieux utilisés sont illustrés dans **les figures 16 et 17**.

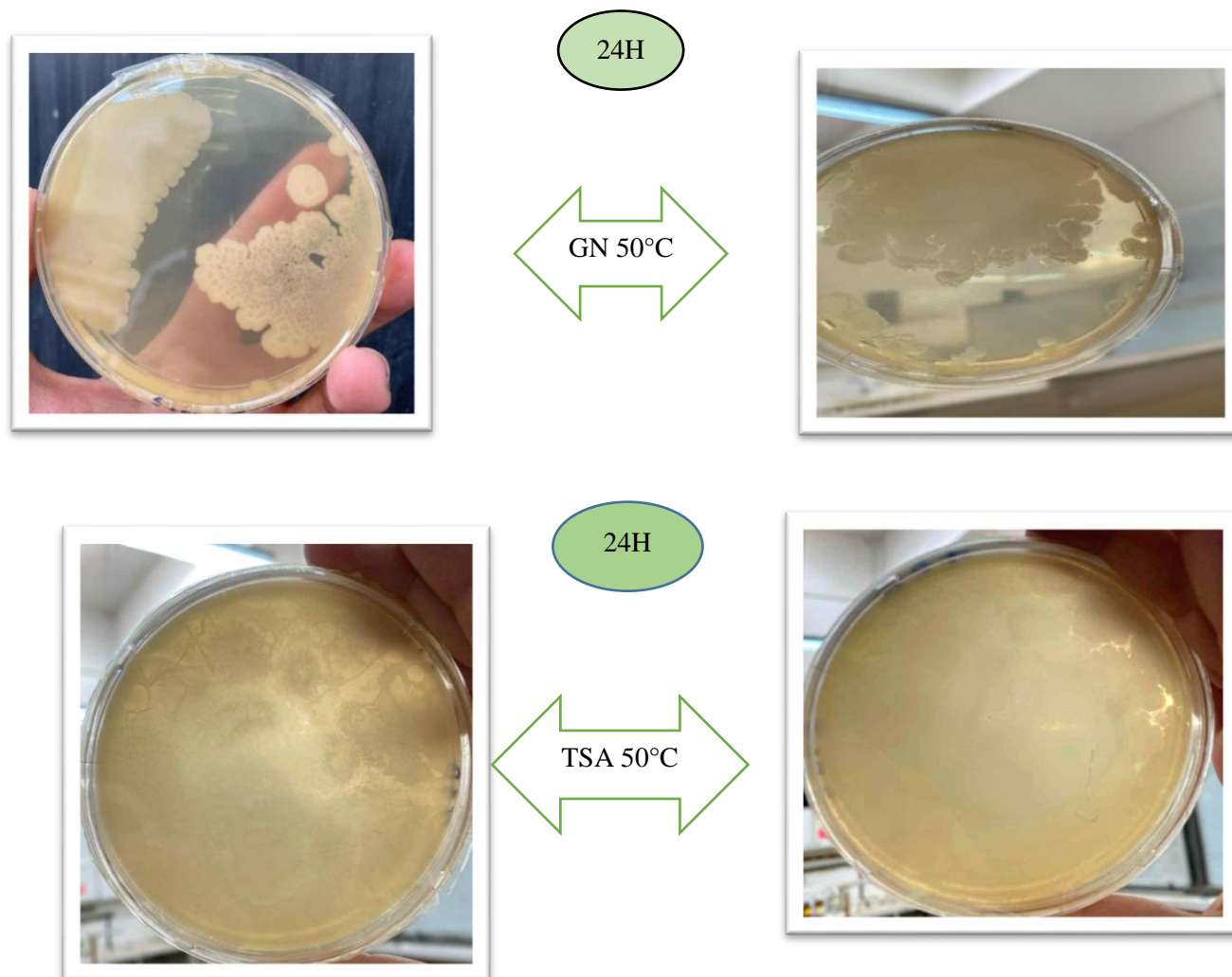
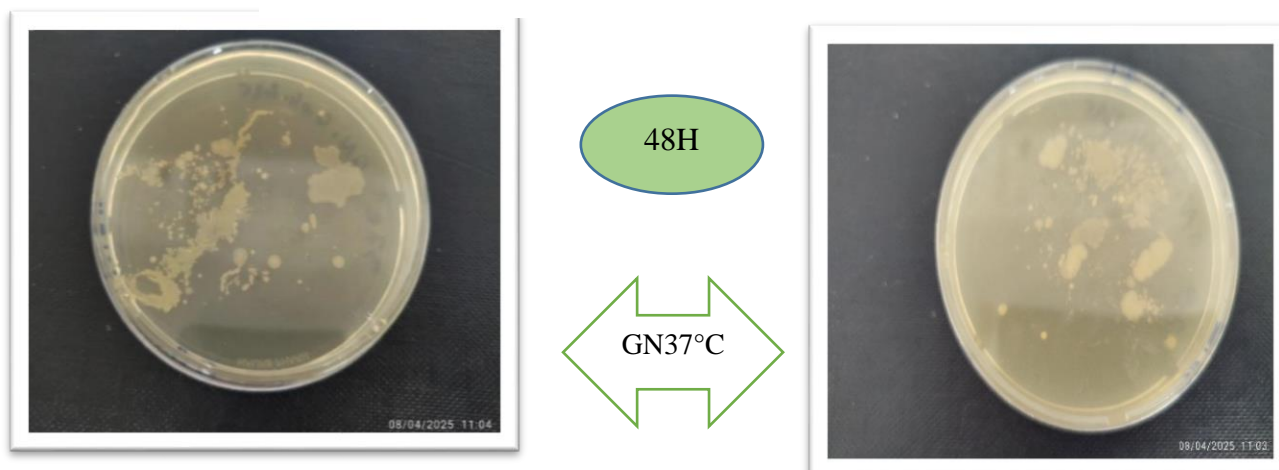


Figure 16 : Photo des colonies isolées sur le milieu GN et TSA a température 50°C.



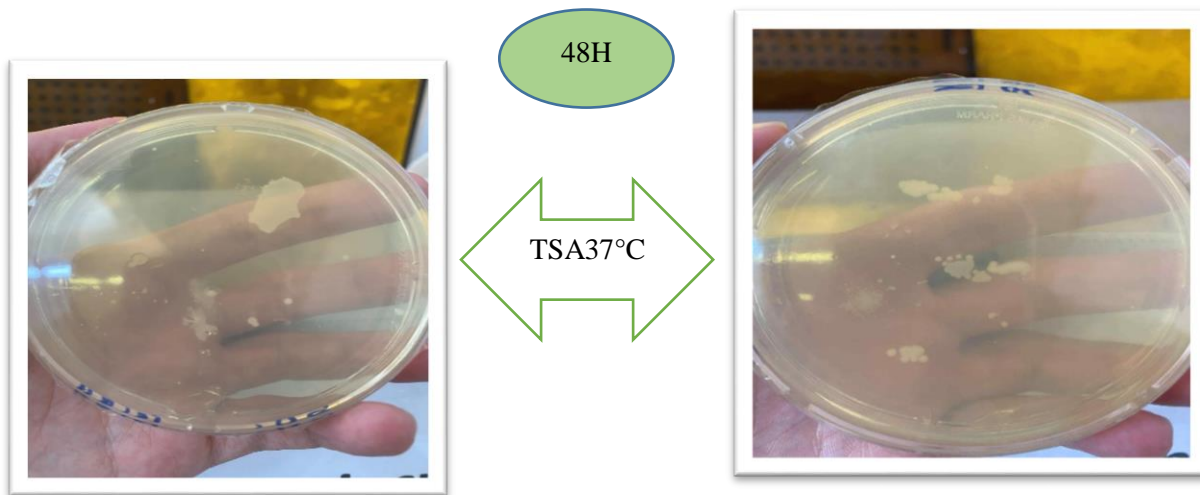


Figure 17 : Photo des colonies isolées sur le milieu GN et TSA a température 37° C.

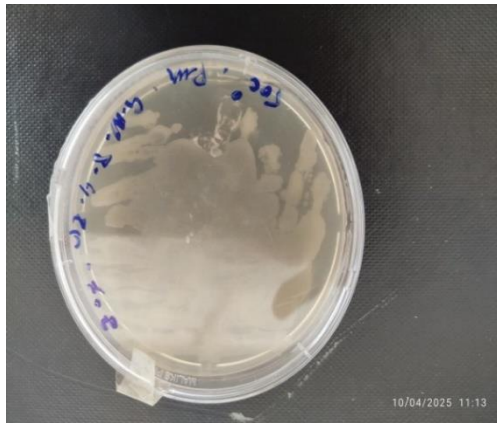
➤ Conditions d'incubation

Les boîtes de Pétri ont été incubées dans une étuve à deux températures distinctes, L'incubation a été effectuée en conditions aérobies pendant 24 à 48 heures.

3.9. Purification :

La purification est une étape cruciale préalable à l'identification bactérienne, car elle permet l'obtention de colonies bien distinctes et isolées, condition indispensable pour garantir une identification rigoureuse et fiable. Les photographies ci-dessous présentent les résultats de la purification de plusieurs souches de bactéries thermophiles isolées de la source thermale d'oued Athmania (grouz), cultivées sur les milieux GN et TSA.

La purification a été réalisée à l'aide de la technique des stries d'épuisement (quatre quadrant), répétée 2 à 3 fois jusqu'à l'obtention de colonies homogènes.



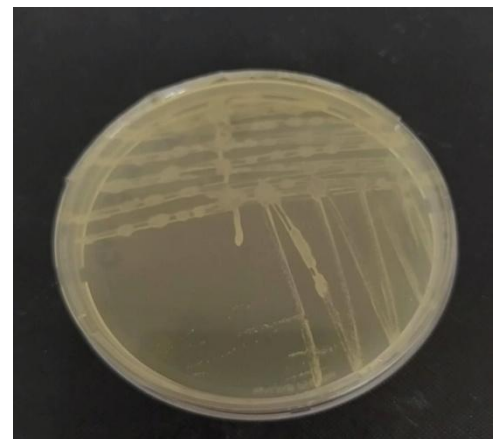
GN 50 °C



GN 37 °C



TSA 50 °C



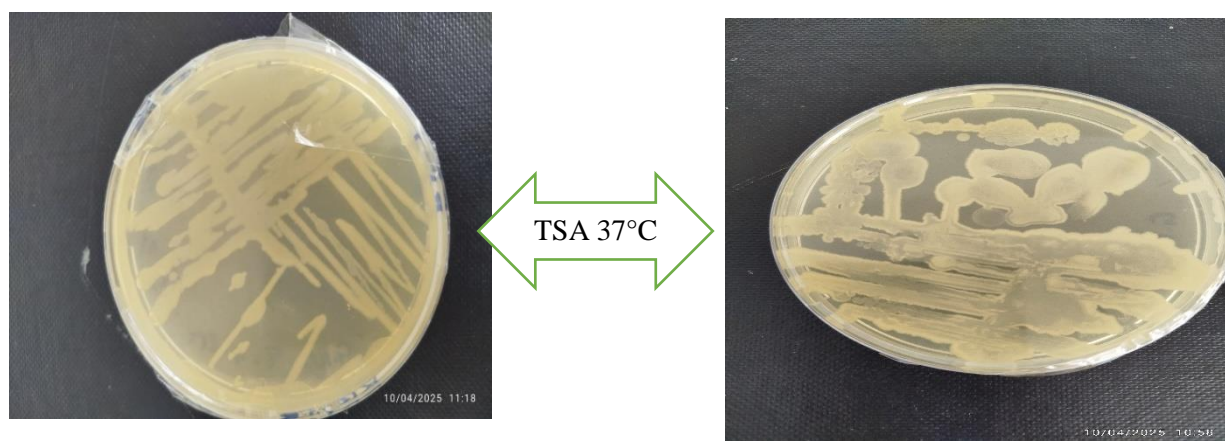


Figure 18 : Photographies des souches isolées de la source thermique hammam grouze.

Le Tableau ci-dessous montrent les résultats de la purification de quelques souches de nos bactéries **tableau 4**

Tableau 4 : Les résultats de la purification

Souche	Forme	Taille	La couleur	Texture, aspect
S1	Irrégulière	Large	Blanchâtre, beige clair	Brillant a mat
S2	Irrégulière	Large	Blanchâtre	Muqueuse
S3	Irrégulière	Large	Blanchâtre	Cotonneuse
S4	Irrégulière	Large	Crème a jaunâtre pale	Lisse
S5	Circulaire	Petite	Crème jaunâtre	Lisse, mat a légèrement brillant
S6	Circulaire	Petite	Crème à jaune	Lisse, très claire
S7	Circulaire a légèrement irrégulières	moyenne	Crème pale	Crémeuse, lisse
S8	Irrégulière	Large	Crème a jaunâtre pâle	Crémeuse et légèrement brillante

3.9.1. La conservation des souches :

Les tubes inclinés sont des tubes à essai contenant un milieu solide (généralement à base d'agar), que l'on incline lors de la solidification pour former une surface plane oblique. Nous avons utilisé pour conserver des cultures pures des micro-organismes **figure 19**.

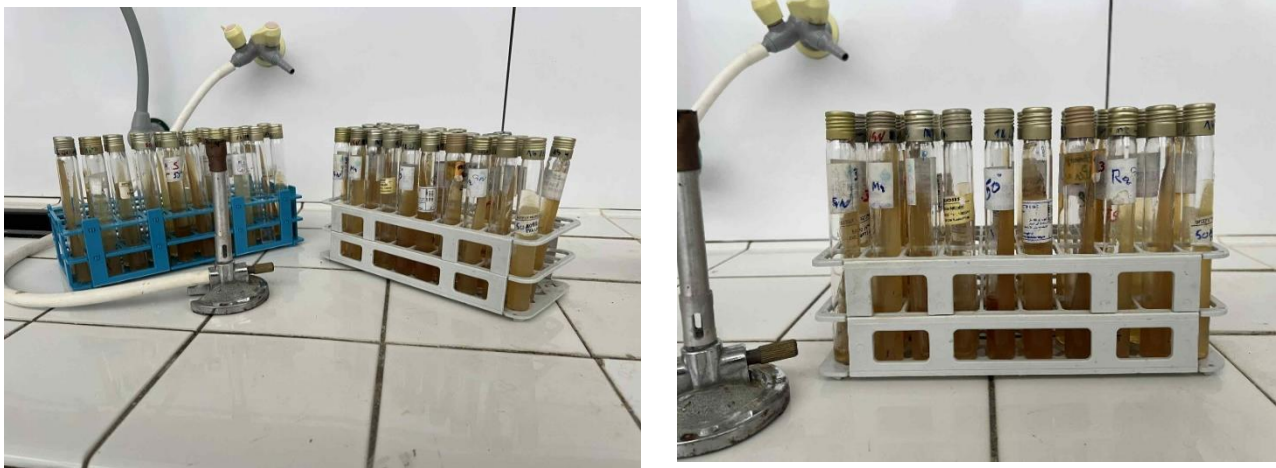


Figure 19 : Conservation sur les tubes inclinés.

3.10. Identification :

3.10.1. Identification microscopique :

Afin d'illustrer ces observations, une photographie générale des lames colorées est présentée ci-après, montrant l'aspect microscopique des échantillons après coloration de Gram, comme le montre la **Figure 20**

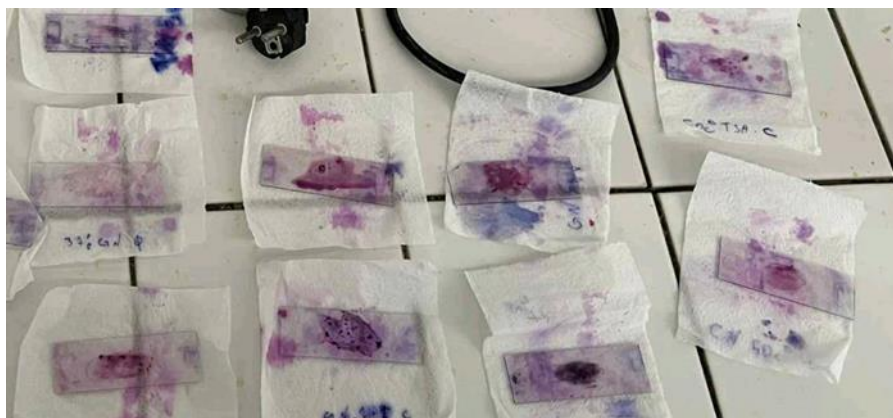


Figure 20: Photographie générale montrant l'ensemble des lames colorées après coloration de Gram.

Le tableau suivant (**Tableau 5**) présente la synthèse des résultats obtenus après la réalisation de la coloration de Gram sur les souches bactériennes isolées. Il regroupe les informations principales observées au microscope, notamment la forme cellulaire et aspect et le mode de regroupement. Ce tableau permet une lecture globale et comparative des caractéristiques morphologiques des isolats.

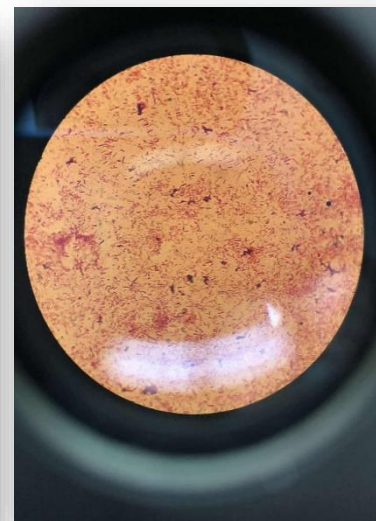
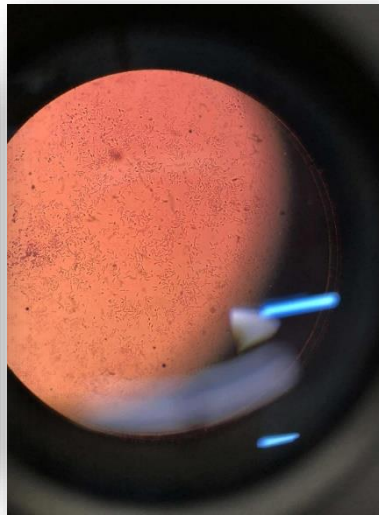
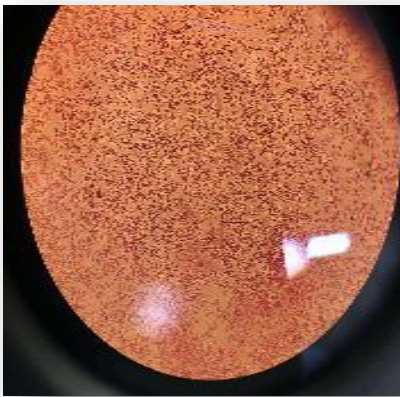
Tableau 5 : Résultats de la coloration de Gram pour les souches bactériennes isolées.

Boîte	Lames	Formes	Gram+	Aspect	Mode de regroupement
Boîte 1	Lame 1	Cocci	-	Lisse	Isolée en paires
	Lame 2	Bacilles	-	Lisse	Isolée en paires
Boîte 2	Lame 4	Cocci	-	Lisse	Isolée en amas
	Lame 5	Bacilles	-	Lisse	Isolée en paires
	Lame 6	Cocci	-	Lisse	Isolée en paires diplocoques
Boîte 3	Lame 7	Cocci	+	Lisse	Isolée en amas
	Lame 8	Bacilles	-	Lisse	Isolée en paires
Boîte 5	Lame 9	Bacilles	-	Lisse	Isolée en paires
Boîte 6	Lame 10	Bacilles	+	Rugueux	Courts chaînes
Boîte 7	Lame 11	Coccobacille	-	Lisse	Isolés en paires
Boîte 8	Lame 12	bacilles	+	Rugueux	Courts chaînes

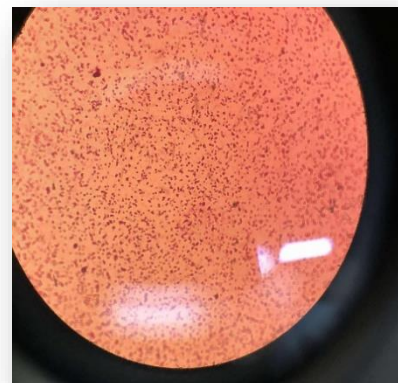
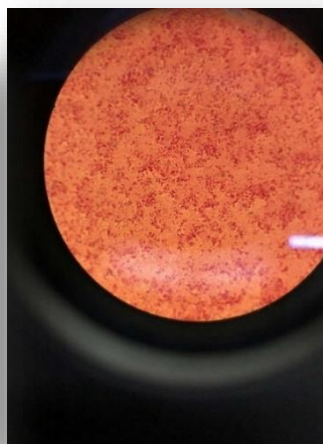
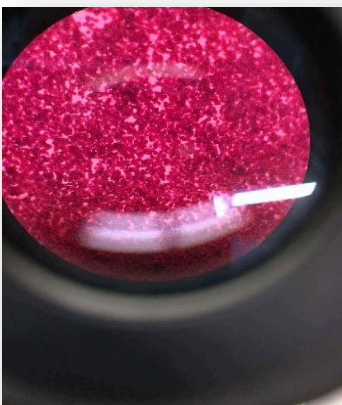
3.10.2. Identification microscopique

Enfin, des micrographies réalisées au microscope optique à immersion (objectif $\times 100$) permettent de visualiser en détail les formes cellulaires et la nature de la paroi bactérienne, confirmant les résultats obtenus par la méthode de Gram. Comme illustré dans la **Figure 21** ci-dessous.

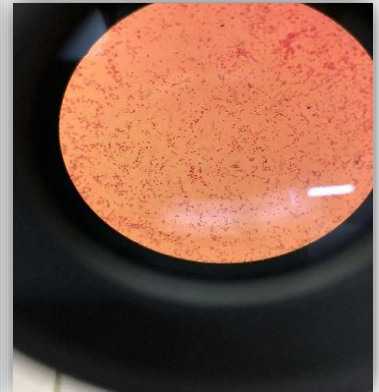
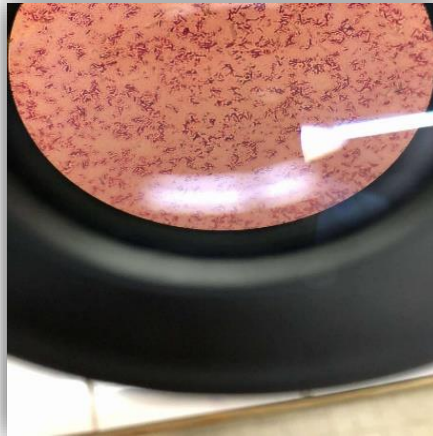
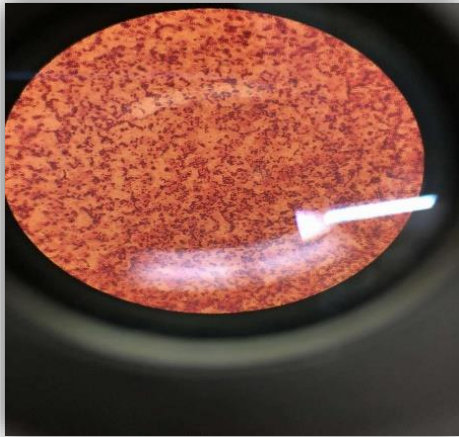
TSA 37 °C



GN 37 °C



TSA 50°C



GN50°C

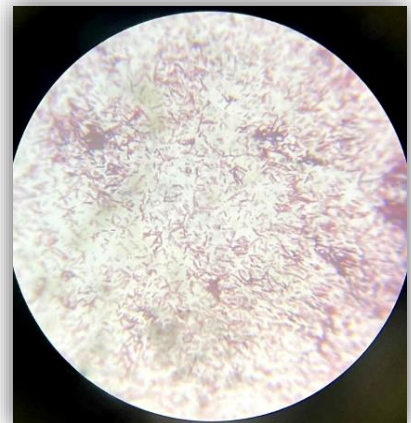
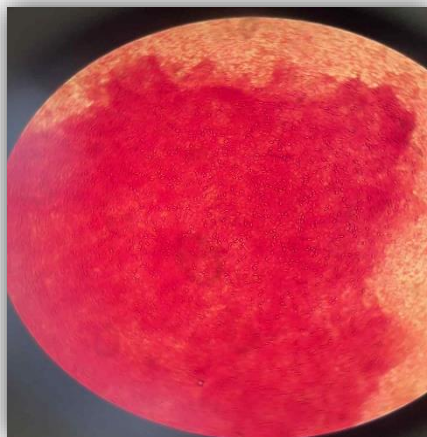
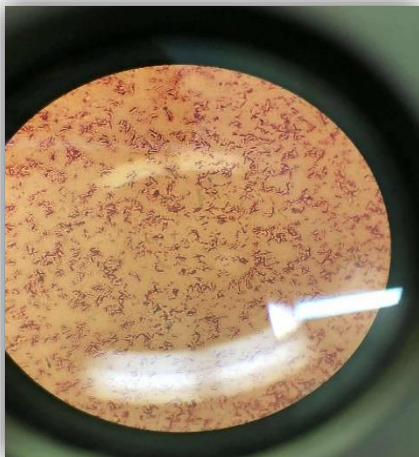


Figure 21 : Aspects microscopique de souches sélectionnées, après observation à l'immersion (x100).

L'observation microscopique après la coloration de Gram a permis d'identifier les types de bactéries isolées selon leur réaction au colorant et leur morphologie.

Les bactéries Gram positives gardent la couleur bleue après le processus de coloration, tandis que les bactéries Gram négatives se colorent en rose.

3.1.1. Mise en évidence des enzymes extracellulaires

La présence de ces activités hydrolytiques a été examinée en faisant appel aux substrats suivants : la caséine, le tween 20 et le tween 80. Nous avons effectué des tests de ces activités enzymatiques sur 9 isolats que nous possédons. Sur les 9 isolats examinés, 5 isolats ont montré une activité protéolytique et lipolytique.

3.1.1.1. Le test de protéasique (protéase)

- **Pour la première méthode :** L'activité protéolytique se manifeste par la formation d'un halo clair autour des colonies, résultant de la dégradation de la caséine présente dans le milieu. Toutes les variétés testées ont montré un halo de clarification, indiquant une activité protéolytique positive, avec des résultats plus marqués à 50 °C, ce qui confirme leur capacité à produire des protéases thermostables. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **figure 22 et 23**.



GN (XS)	TSA (S)
	
GN (xs) protéase +	TSA (s) protéase +

Figure 22 : Les résultats de test protéasique à température 37 °C.


		
		
TSA (A) 50°C Protéase positive (+)	TSA (B) 50°C ,Protéase positive (+)	GN 1.1 50°C Protéase négative (+)

Figure 23 : Le résultat du test protéolytique pour la première méthode à 50 °C

Pour la deuxième méthode : La production de protéases a été démontrée par la formation de halos de clarification autour des colonies cultivées sur milieux contenant du lait écrémé ; Les résultats obtenus dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : *Activité protéolytique observées chez les souches bactériennes isolées.*

Souche	S1	S2	S3	S4	S5
Caséine	+	+	–	–	–

Remarque : + : activité enzymatique observée (présence de halo) ;

– : aucune activité détectée

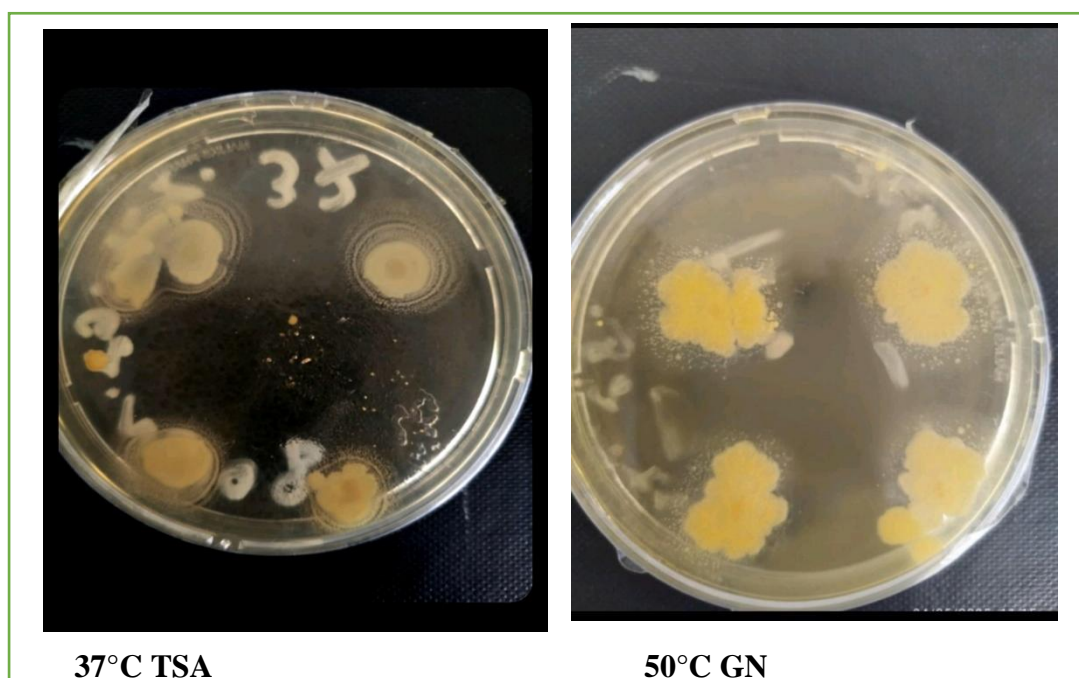


Figure 24 : *Le résultat du test protéolytique pour la deuxième méthode.*

3.11.2. Le test de l'activité lipolytique :

L'activité lipolytique a été observée par la formation d'un halo opalescent ou blanchâtre autour des colonies, indiquant l'hydrolyse des lipides. Certaines souches ont présenté une activité lipolytique positive, avec des halos bien visibles, autre souches absence d'activité lipolytique.

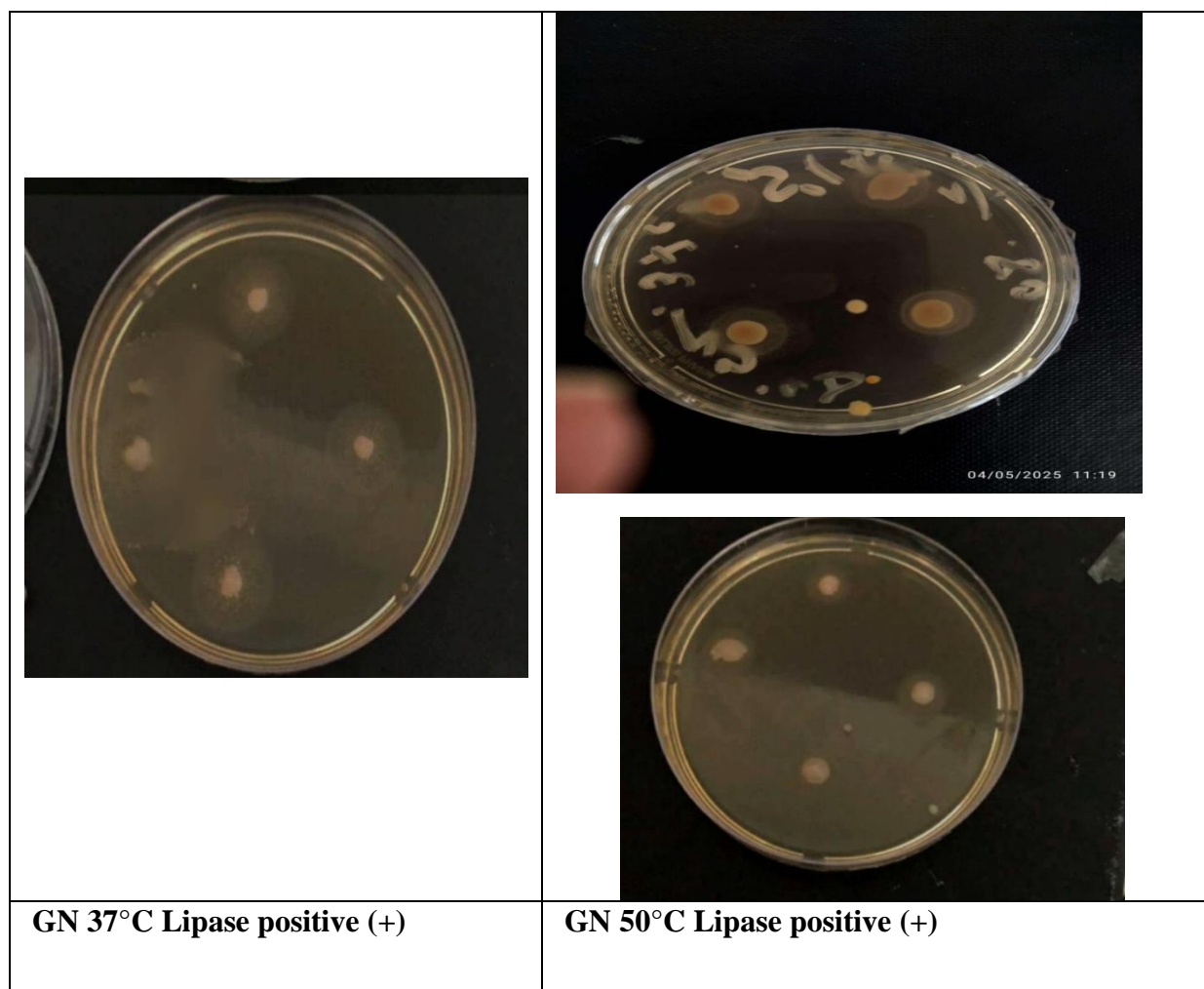


Figure 25 : Résultats de tests lipolytiques.

Les résultats de test lipolytique sont présentés dans le **tableau 7** suivant :

Tableau 7 : Résultats des tests lipolytiques enzymatiques des souches isolées.

Souche	Tween 20	Tween 80
S4 37°C	+	/
S5 50°C	/	+
S6 50°C	+	/

S7 37°C	—	—
S8 37°C	—	—
S9 50°C	—	—
S10 50°C	—	—

1.2. Résultats de la galerie API 20E :

Nous précisons que la température d'incubation est de 37°C et de 50 °C. Les résultats de la galerie API 20NE réalisée sur les bactéries thermophiles isolées de la source thermale de hammam Grouz, figure 26.



Figure 26 : Galeries API 20E appliquées sur le milieu GN ; TSA à température de 37°C et 50°C.



- Souche R2 et A 50°C

Tableau 8 : Résultats de la galerie API 20 E A température 50°C.

Souche	GN R2 50°C	TSA A 50 °C
ADH	+	-
LDC	-	-
ODC	-	-
CIT	+	-
H2S	-	-
URE	+	-
TDA	+	+

IND	-	-
VP	-	+
GEL	+	+
GLU	+	-
MAN	-	+
INO	-	-
SOR	-	+
RHA	-	-
SAC	-	+
MEL	-	-
AMY	-	+
ARA	-	-

- Souche S et XS 37°C

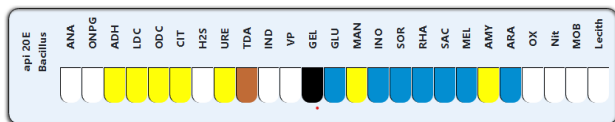
Tableau 9:Résultats de GALRIE API E a température 37°C .

Souche	GN S 37 °C	GN XS 37 °C
OPGN	-	-
ADH	-	-
LDC	-	-
ODC	-	-
CIT	-	+
H2S	-	-
URE	-	+

TDA	+	+
IND	-	-
VP	+	-
GEL	-	+
GLU	-	+
MAN	-	-
INO	-	-
SOR	-	-
RHA	-	-
SAC	-	-
MEL	-	-
AMY	-	-
ARA	-	-

La lecture des résultats obtenus après 24h d'incubation sont les suivants, figure 27:

Aneuribaccillus aneurunilyticus



api 20E Bacillus	ANA	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	Nit	MOB	Lecith
+	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
-	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

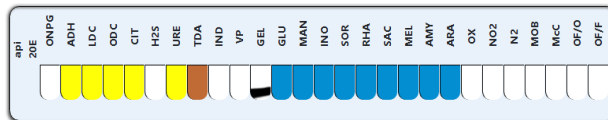
Calcul direct 1 Calcul avec exclusion(s) 29 Légende

Les calculs proposent (cliquez sur ? pour voir les détails du profil) :

1. *Aneuribaccillus aneurunilyticus* ? avec une probabilité de 61.4 % (très bonne identification)

61.4%

Orcgorobactrum anthropi



api 20E Bacillus	ANA	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO2	N2	MOB	McC	OF/O	OF/F
+	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
-	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Calcul direct 2 Calcul avec exclusion(s) 70 Légende

Les calculs proposent (cliquez sur ? pour voir les détails du profil) :

1. *Ochrobactrum anthropi* ? avec une probabilité de 52.1 % (très bonne identification)

52.1%

Sporosarcina pasteurii



api 20E Bacillus																									
	ANA	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	Nit	MOB	Lecith
+	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
-	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Calcul direct 1 Calcul avec exclusion(s) 18 Légende

Les calculs proposent (cliquez sur ? pour voir les détails du profil) :

1. *Sporosarcina pasteurii* ? avec une probabilité de 100 % (excellente identification)

100%

© UPBM 2017-2025

Bordetella/alcalignes
/Moraxella spp



api 20E Bacillus	ANA	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO2	N2	MOB	McC	OF/O	OF/F
+	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
-	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Calcul direct 1 Calcul avec exclusion(s) 35 Légende

Les calculs proposent (cliquez sur ? pour voir les détails du profil) :

1. *Bordetella/Alcaligenes/Moraxella spp (Brucella spp possible)* ? avec une probabilité de 99.3 % (excellente identification)

99.3%

Les taxons ayant une probabilité trop faible (< 5%) sont éliminés.

Figure 27 : GALRIE API 20E appliquée sur le milieu GN ;TSA a température de 37°C et 50°C sur site UMPG

Discussion

L'analyse des profils biochimiques joue un rôle crucial dans l'identification phénotypique des bactéries, surtout pour la caractérisation de souches provenant d'environnements extrêmes tels que les sources thermales. Dans le contexte de ce projet, divers isolats bactériens préalablement choisis pour leur potentiel à générer des enzymes extracellulaires ont été soumis à un test d'identification en utilisant la galerie API 20 E. Cet instrument, fréquemment employé dans l'analyse des bacilles Gram-négatifs, facilite la détection de diverses activités fermentatives et enzymatiques pour déterminer une empreinte métabolique spécifique à chaque souche. L'analyse des profils biochimiques a été effectuée en utilisant le logiciel **UPBM API**, qui simplifie l'interprétation des données phénotypiques et améliore la précision de l'identification bactérienne.

Les résultats des essais de la galerie API 20E indiqués dans le **tableau 9** nous ont conduit à identifier des genres bactérien différent. Parmi les souches isolées, une seule a montré un caractère clairement thermophile *Aneurinbacillus aneurinilyticus*, avec une croissance optimale à des températures élevées. Les deux souches restantes ont montré une croissance uniquement à 37°C, *Orchrobactrum antharopi*, *Bordetella/alcaligenes/maroxella spp*.

- Résultats des identifications

1. *Aneurinbacillus aneurinilyticus* avec un bon pourcentage d'identification de **61,4%**
2. *Sporosarcina pasteurii* avec excellente identification **100%**
3. *Orchrobactrum antharopi* très bonne identification de **52,1%**
4. *Bordetella/alcaligenes/maroxella spp* avec excellente identification **99,3%**

Parmi les caractéristiques observées chez les différentes souches bactériennes isolées

- *Aneurinibacillus aneurinilyticus*, également nommée *Bacillus aneurinolyticus* est un micro-organisme thermophile qui peut proliférer à des températures allant de 40°C à 60°C, sa température idéale étant autour de 50°C. Elle se trouve majoritairement dans des habitats chauds et à forte teneur organique, comme les sources thermales naturelles et les sols géothermiques. Cette bactérie, capable de générer des enzymes thermostables comme les lipases, suscite un grand intérêt pour de nombreuses applications industrielles, y compris dans les secteurs cosmétique, alimentaire et pharmaceutique (Ulucay et al., 2022).

• **Le genre *Ochrobactrum*** regroupe des bactéries environnementales fréquemment isolées à partir du sol et de milieux aquatiques. Il s'agit de bacilles Gram négatif, aérobies stricts, mobiles, présentant une activité oxydasique positive et une réaction indole négative. (Delarras, 2007) .

- ***Bordetella/alcaligenes/moraxella spp***

On retrouve les **alcaligènes** dans l'eau et le sol. Les Alcaligènes sont des bactéries aérobies qui se colorent en négatif lors du test de Gram, bien que certaines souches soient aptes à réaliser une respiration anaérobie en présence de nitrite ou de nitrate. Elles sont positives pour la catalase et l'oxydase. Il s'agit de petits bâtonnets ou coques. Une des caractéristiques marquantes des Alcaligenes est leur emploi en biotechnologie. Ils génèrent un polymère qui ressemble au plastique, servant de référence pour la fabrication industrielle de matériaux biodégradables. Les Alcaligenes se développent idéalement à une température comprise entre 30 et 37 °C (Betts, 2006).

Le genre ***Bordetella*** comprend des coccobacilles à Gram négatif, aérobies stricts .Ce genre est généralement retrouvé dans des environnement variés tels que les sols et les zones hydriques (Moreau et al., 2021).

Les bactéries du genre ***Moraxella*** sont des bâtonnets ou coques à Gram négatif et catalase oxydase positive. Elles sont généralement immobiles et nécessitent des conditions aérobies pour survivre (Yang, 2014).

Cette étude souligne la grande diversité des bactéries thermophiles productrices d'enzymes, qui ont été isolées à partir de la source thermique examinée. L'application de milieux de culture spécifiques (GN et TSA) combinée à des méthodes d'isolement strictes a conduit à l'identification de souches distinctes affichant une diversité morphologique, physiologique et enzymatique.

L'observation de la croissance bactérienne à diverses températures a mis en évidence une croissance optimale à 50°C, ce qui atteste du caractère thermophile des souches. Cependant, à une température de 37°C, la croissance est demeurée faible, voire inexistante, ce qui suggère que ces bactéries sont parfaitement adaptées à des conditions thermiques

Conclusion :

Conclusion générale

Les avancées récentes en biotechnologie ont mis en lumière l'importance des microorganismes extrêmophiles, notamment les bactéries thermophiles, comme sources prometteuses de biocatalyseurs industriels. Grâce à leur capacité à produire des enzymes actives dans des conditions extrêmes, ces bactéries occupent aujourd'hui une place centrale dans le développement de procédés innovants, plus efficaces et plus respectueux de l'environnement.

On cherche particulièrement les enzymes thermostables, comme les protéases et les lipases, pour leur robustesse, leur performance et leur capacité d'adaptation à divers domaines industriels : l'agroalimentaire, la pharmacie, le textile, le traitement des déchets et la production d'énergie. L'utilisation de ces ressources biologiques provenant d'environnements naturels tels que les sources thermales constitue donc un enjeu crucial pour une biotechnologie durable et efficace.

Cette stratégie implique donc de renforcer l'étude des écosystèmes locaux, qui sont encore largement inexplorés, dans le but de découvrir de nouvelles souches microbiennes présentant un potentiel significatif. Cela non seulement répondra à la demande industrielle grandissante, mais aussi valorisera les ressources naturelles algériennes dans une perspective scientifique et économique..

Références

Références :

- Ananta, Y., 2024. Literature Review on Characterization and Optimization of Protease Enzymes for Medical Applications. *Dinasti Health Pharm. Sci.* 2, 43–50. <https://doi.org/10.38035/dhps.v2i2.1824>
- Atalah, J., Cáceres-Moreno, P., Espina, G., Blamey, J.M., 2019. Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresour. Technol.* 280, 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.008>
- Bekkouche, mohamed faouzi, 2016. CARACTERISTIQUES HYDROCHIMIQUES DES SOURCES THERMALES DE L'EXTREME NORD-EST ALGERIEN (these). BADJI MOKHTAR-ANNABA, annaba.
- Belhaine, B., Latreche, M., 2016. Isolement et criblage enzymatiques et antimicrobiens de bactéries thermophiles de Hammem Debagh.
- Benzerfa, D., Chenina, N., Cherouine, N., 2021. Isolement et identification des bactéries thermophiles à partir de la station thermale de hammam Sidi Aissa wilaya de Saïda.
- Betts, G., 2006. 23 - Other spoilage bacteria, in: Blackburn, C. de W. (Ed.), *Food Spoilage Microorganisms*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, pp. 668–693. <https://doi.org/10.1533/9781845691417.5.668>
- Byrne, N., 2008. Etude de la diversité métabolique des micro-organismes des sources hydrothermales.
- Che Hussian, C.H.A., Leong, W.Y., 2023. Thermostable enzyme research advances: a bibliometric analysis. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 21, 37. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00494-w>
- Cros, E., 2011. Etude de la dynamique du Geyser Old Faithful, USA, à partir de méthodes de sismique passive (phdthesis). Université de Grenoble.
- de Souza, P.M., de Oliveira Magalhães, P., 2010a. Application of microbial α -amylase in industry – A review. *Braz. J. Microbiol.* 41, 850–861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>
- Delarras, C., 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire., Tec et Doc. Editions Tec et Doc.
- Detay, M., Thomas, P., 2013. Hydrovolcanologie appliquée à la phrase hydrothermale : fumeroles, solfatares, geysers, lacs acides, mofettes, source chaudes.
- Fickers, P., Destain, J., Thonart, P., 2008. Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications.
- Foued, B., 2018. LE GEOTHERMALISME DE LA REGION DE GUELMA.
- Gardner, A.F., Kelman, Z., 2014. DNA polymerases in biotechnology. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00659>
- Gomaa, A., 2018. Application of Enzymes in Brewing [WWW Document]. URL https://www.researchgate.net/publication/323252887_Application_of_Enzymes_in_Brewing (accessed 6.1.25).
- Guerrand, D., 2017. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. *OCL* 24, D403. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017031>

Références

- Hussin, N. akmar, Ismail, asma, Balakrishnan, venugopal, Lachimanan, Y.L., 2011. Identification of appropriate sample and culture method for isolation of new thermophilic bacteria from hot spring [WWW Document]. URL https://www.researchgate.net/publication/267381643_Identification_of_appropriate_sample_and_culture_method_for_isolation_of_new_thermophilic_bacteria_from_hot_spring (accessed 5.28.25).
- Janevski, A., Zhezhova, S., Mojsov, K., Andronikov, D., 2014. (PDF) Hyperthermophilic Enzymes with Industrial Applications [WWW Document]. ResearchGate. URL https://www.researchgate.net/publication/271365272_Hyperthermophilic_Enzymes_with_Industrial_Applications (accessed 6.1.25).
- Katsimpouras, C., Stephanopoulos, G., 2021. Enzymes in biotechnology: Critical platform technologies for bioprocess development. *Curr. Opin. Biotechnol., Chemical Biotechnology • Pharmaceutical Biotechnology* 69, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.003>
- Kresic, N., 2010. Chapter 2 - Types and classifications of springs, in: Kresic, N., Stevanovic, Z. (Eds.), *Groundwater Hydrology of Springs*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 31–85. <https://doi.org/10.1016/B978-1-85617-502-9.00002-5>
- Kumar, A., Singh, V.P., 2011. THERMOPHILIC BACTERIA AND THEIR POTENTIAL FOR INDUSTRIAL APPLICATIONS.
- Laouamri, H., 2024. Essai d'isolement des bactéries thermophiles productrices d'enzymes à partir de la source thermale de Béni Guecha. Wilaya de (Mila).
- Lebaron, P., 2020. Les eaux thermales : quand minéralité et signature biologique se combinent pour expliquer leurs propriétés 147, 1S20-1S24. [https://doi.org/10.1016/S0151-9638\(20\)30032-6](https://doi.org/10.1016/S0151-9638(20)30032-6)
- Lefebvre, L., 2021. Les différents types d'eaux thermales et leurs bienfaits. Off. Therm. URL <https://www.officiel-thermalisme.com/2021/11/18/les-differents-types-deaux-thermales-et-leurs-bienfaits/> (accessed 5.19.25).
- Li, W.F., Zhou, X.X., Lu, P., 2005. Structural features of thermozymes. *Biotechnol. Adv.* 23, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.002>
- Liu, X., Kokare, C., 2017. Chapter 11 - Microbial Enzymes of Use in Industry, in: Brahmachari, G. (Ed.), *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Academic Press, pp. 267–298. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>
- MAOUCHE, S., MEDJEDOU, D., 2020. Etude bibliographique portant sur les environnements chauds: Les microorganismes thermophiles et leurs applications. Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou.
- Maude, B., 2000. obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie appliquée. Université du Québec Institut National de la Recherche Scientifique Institut Armand-Frappier.
- Moreau, P.K., de Lyon, U., Forestier, P.C., Clermont-Auvergne, U., Cournoyer, D.B., Gaudriault, D.S., Inrae, D., Marchandin, P.H., Dupont, D.C., Chiron, D.R., 2021. Sous la direction du Pr. Hélène Marchandin et du Dr. Chloé Dupont.
- Msarah, M.J., Ibrahim, I., Hamid, A.A., Aqma, W.S., 2020. Optimisation and production of alpha amylase from thermophilic *Bacillus* spp. and its application in food waste biodegradation. *Heliyon* 6, e04183. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04183>
- Pandey, A., Dhakar, K., Sharma, A., Priti, P., Sati, P., Kumar, B., 2015. Thermophilic bacteria that tolerate a wide temperature and pH range colonize the Soldhar (95 °C) and Ringigad (80 °C) hot

Références

- springs of Uttarakhand, India. *Ann. Microbiol.* 65, 809–816. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0921-0>
- Perfumo, A., Banat, I.M., Marchant, R., 2006. The use of thermophilic bacteria in accelerated hydrocarbon bioremediation, in: *Environmental Problems in Coastal Regions VI*. Presented at the COASTAL ENVIRONMENT 2006, WIT Press, Rhodes, Greece, pp. 67–77. <https://doi.org/10.2495/CENV060071>
- Pissochet, L.C., 2021. Eaux thermales : utilisation en dermatologie et dermocosmétiques dérivés 183.
- Postic, A., 2005. Diversité de populations microbiennes thermophiles d'une cheminée hydrothermale océanique : cultures d'enrichissement en bioréacteur et isolement d'espèces nouvelles.
- Prieur, D., 2014. Les bactéries de l'extrême. De Boeck Supérieur.
- Ranganathan, S., Mahesh, S., Suresh, S., Nagarajan, A., Z. Sen, T., M.Yennamalli, R., 2022. Experimental and computational studies of cellulases as bioethanol enzymes. *Bioengineered* 13, 14028–14046. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2085541>
- sadeepa, dilini, manage, pathmalal, sirisena, kosala, 2024. (PDF) Microbial Diversity in the Genomic Era: Functional Diversity and Community Analysis SECOND EDITION Edited by [WWW Document]. URL https://www.researchgate.net/publication/379484897_Microbial_Diversity_in_the_Genomic_Era_Functional_Diversity_and_Community_Analysis_SECOND_EDITION_Edited_by (accessed 5.24.25).
- Saibi, H., 2009. Geothermal resources in Algeria. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 13, 2544–2552. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.06.019>
- Samad, M.Y.A., Razak, C.N.A., Salleh, A.B., Zin Wan Yunus, W.M., Ampon, K., Basri, M., 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity. *J. Microbiol. Methods* 9, 51–56. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(89\)90030-4](https://doi.org/10.1016/0167-7012(89)90030-4)
- Sanders, L., 2006b. Les eaux thermales en traitement adjuvant dermatologique et dermo-cosmétologique: exemple de l'eau thermale d'Avène.
- Satyanarayana, T., Littlechild, J., Kawarabayasi, Y., 2013. Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles. Springer Science & Business Media.
- Schumr, M.A., Thum, O., 2013. (PDF) Immobilised lipases in the cosmetics industry [WWW Document]. URL https://www.researchgate.net/publication/236067552_Immobilised_lipases_in_the_cosmetics_industry (accessed 5.30.25).
- Schwenke, A., 2007. De l'usage de l'eau thermale en nébuliseur (other). UHP - Université Henri Poincaré.
- Sharada, R., Venkateswarlu, G., Venkateswar, S., AnandRao, M., 2014. APPLICATIONS OF CELLULASES – REVIEW.
- Suresh, A., Shravan Ramgopal, D., Panchamoorthy Gopinath, K., Arun, J., SundarRajan, P., Bhatnagar, A., 2021. Recent advancements in the synthesis of novel thermostable biocatalysts and their applications in commercially important chemoenzymatic conversion processes. *Bioresour. Technol.* 323, 124558. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124558>
- Thiroux, S., 2019. Etudes des interactions entre virus et hôtes archéens hydrothermaux hyperthermophiles.

Références

Ulucay, O., Gormez, A., Ozic, C., 2022. Identification, characterization and hydrolase producing performance of thermophilic bacteria: geothermal hot springs in the Eastern and Southeastern Anatolia Regions of Turkey. *Antonie Van Leeuwenhoek* 115, 253–270. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01678-5>

Vavitsas, K., Glekas, P.D., Hatzinikolaou, D.G., 2022. Synthetic Biology of Thermophiles: Taking Bioengineering to the Extremes? *Appl. Microbiol.* 2, 165–174. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010011>

Yang, X., 2014. Moraxellaceae, in: Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition). Academic Press, Oxford, pp. 826–833. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00441-9>

Zhao, J., Liu, F., 2024. Enzymes in Food Industry: Fermentation Process, Properties, Rational Design, and Applications. *Foods* 13, 3196. <https://doi.org/10.3390/foods13193196>

<https://www.naturephotographie.com/>

<https://www.alamyimages.fr/>

<https://www.tripadvisor.fr/>

<https://fr.dreamstime.com/>

<https://www.philippe-crochet.com/>

<https://i.ytimg.com/vi/3BqENhyhCSA/maxresdefault.jpg>

<https://cdn.futura-sciences.com/sources/images/diaporama/1294-geysers/album-geyser3.jpg>

ANNEXE

Annexe

Matériel non biologique

- Autoclave (WEBECO Allemagne)
- Etuve (BINDER Allemagne)
- Bain marie (MEMMERT Allemagne)
- Agitateur chauffant a barreau magnétique (GARHARDT Allemagne)
- Balance (KERN 770 Allemagne)
- Réfrigérateur (ENIEM Algérie)
- Microscope photonique
- Bec bunsen
- Boîtes Pétri
- Pipettes Pasteur
- Erlenmeyer
- Eprouvette
- Flacons en verre
- Tubes à essai en verre

Résumé

Resumé

Ce travail s'inscrit dans une démarche de valorisation de la biodiversité microbienne présente dans les milieux extrêmes, à travers l'isolement et la caractérisation de bactéries thermophiles issues de la source thermale de Hammam Grouz, localisée à Oued Athmania (wilaya de Mila, Algérie).

Des échantillons d'eau ont été prélevés sur site, puisensemencés sur deux milieux de culture spécifiques: TSA (Tryptic Soy Agar) et gélose nutritive (GN). Les cultures ont été incubées à 37 °C et 50 °C afin d'évaluer la diversité bactérienne selon la température. Les souches isolées ont été purifiées et soumises à une étude morphologique, complétée par une coloration de Gram.

Des tests enzymatiques ont permis de détecter la production de protéases et de lipases chez certaines souches, soulignant ainsi leur potentiel enzymatique et leur intérêt pour de futures applications en biotechnologie

.Abstract :

This work is part of an approach to promoting microbial biodiversity present in extreme environments, through the isolation and characterization of thermophilic bacteria from the Hammam Grouz thermal spring, located in Oued Athmania (wilaya of Mila, Algeria).

Water samples were taken on site and then inoculated onto two specific culture media: TSA (Tryptic Soy Agar) and nutrient agar (NG). The cultures were incubated at 37°C and 50°C to assess bacterial diversity according to temperature. The isolated strains were purified and subjected to a morphological study, supplemented by Gram staining. Enzymatic tests have detected the production of proteases and lipases in certain strains, highlighting their enzymatic potential and their interest for future applications in biotechnology.

Keywords: Antimicrobial resistance, Hammam Jaruz spring, applications in biotechnology, lipase enzyme

الملخص :

لتنوع البيولوجي الميكروبي الموجود في البيئات القاسية، من خلال عزل وتوصيف البكتيريا المحبة للحرارة من نبع حمام قروز الحراري الواقع في وادي عثمانية (ولاية ميله، الجزائر).

جُمعت عينات المياه من الموقع، ثم نُفّحت في وسطين زراعيين مُخصصين: أجار الصويا التريسين (TSA) وأجار المغذيات (NAG). حُضنت المزارع عند درجتَي حرارة 37 و 50 درجة مئوية لتقييم التنوع البكتيري وفقاً لدرجة الحرارة. نُقّيت السلالات المعزولة وأُجريت عليها دراسة مورفولوجية، مُكملة بصبغة غرام.

وقد أُنحت الاختبارات الأنزيمية إمكانية اكتشاف إنتاج البروتياز والليباز في سلالات معينة، مما يسّط الضوء على إمكاناتها الأنزيمية واهتمامها بالتطبيقات المستقبلية في التكنولوجيا الحيوية.

الكلمات الرئيسية : البكتيريا المحبة للحرارة، نبع حمام جروز الحراري، الإنزيم، التطبيقات في التكنولوجيا الحيوية، الليباز

<p align="center">Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master</p>	
<p>Filière : Biotechnologie</p>	
<p>Spécialité : Biotechnologie et Biothérapie</p>	
<p>Essai d'isolement des bactéries thermophiles productrices d'enzymes à partir de la source thermale de Hammam grouze oued athmania . Wilaya de (Mila).</p>	
<p>Résumé: Les bactéries thermophiles sont des micro-organismes qui prospèrent à des températures élevées, souvent dans des environnements extrêmes comme les sources chaudes ou les fonds sous-marins. Elles sont adaptées grâce à des membranes et des protéines thermostables. Les résultats de l'étude ont montré que ces bactéries produisent des enzymes résistantes à la chaleur (comme les amylases, lipases, cellulases et protéases). Ces enzymes sont largement utilisées en biotechnologie, dans l'industrie agroalimentaire, textile, pharmaceutique, ainsi que pour le traitement des déchets et la production de bioéthanol. Il convient de saisir l'opportunité de consacrer davantage de recherches à ces bactéries et d'essayer de tirer profit de leurs propriétés, notamment dans le domaine de la biotechnologie.</p>	
<p>Mots-clefs : Bactéries thermophiles, Source thermale Hammam Grouze ,Enzyme, Applications en biotechnologique, lipase .</p>	
<p>Laboratoires de recherche : laboratoire de microbiologie générale (UFM Constantine1).</p>	
<p align="center">Jury d'évaluation :</p>	
<p>Encadrant : ADJEROUD Moussa</p>	<p>(M.C.A) - Université Frères Mentouri, Constantine 1).</p>
<p>Président : Benhamdi Asma</p>	<p>(M.C.A) - Université Frères Mentouri, Constantine 1).</p>
<p>Examinatrice: Milet Asma</p>	<p>(M.A.B) - Université Frères Mentouri, Constantine 1).</p>
<p>Présenté par : Abid Souha , Mellaoui Aymen Abderhman ,Selmanee yassir Haithame</p>	
<p align="center">Année universitaire 2024-2025</p>	