



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

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



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

Benzerfa Djamila

Chenina Naima

Cherouine Nedjiya

Thème

Isolement et identification des bactéries thermophiles à partir de la station thermale de hammam Sidi Aissa wilaya de Saïda.

Soutenu le : 12/07/2021.

Jury :

Grade

Président : ACEM. K.

Pr

Université d'IBN KHALDOUN- Tiaret

Encadrant : ABDI. F. Z.

Magistère

Université d'IBN KHALDOUN- Tiaret

Examineur 1 : ABBES. A.

MCA

Université d'IBN KHALDOUN- Tiaret

Année universitaire 2020-2021

Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à remercier ALLAH, qui nous a donné la force pour terminer ce travail.

Nous exprimons nos sincères remerciements :

A nos parents pour leur contribution pour chaque travail que nous avons effectué.

A notre encadrant Mme ABDJ F.Z pour ses aides, sa confiance, ses orientations et ses conseils précieuses.

Nous remercions M. ACEM.K pour avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Nous remercions également M. ABBES M.A d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail. A l'ensemble des enseignants du département de biologie.

Merci aussi à tous les membres du laboratoire de reproduction des animaux de ferme.

Nous remercier Ali rabeih

A tous les étudiants de notre promotion MASFER microbiologie appliquée.

Sans oublier ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

***JE REMERCIE TOUT D'ABORD, ALLAH, LE TOUT PUISSANT ET
CLEMENT DE M'AVOIR AIDE A REALISER CE TRAVAIL.***

***JE DEDIE ENSUITE CE FAMEUX TRAVAIL AUX PLUS
EXCEPTIONNELS QUI EXISTENT DANS LE MONDE,
MON ENCADREUR MR ABDI.F. Z, QUI MERITENT TOUS MON
RESPECT ET TRIBUT.***

A TOUTE LA FAMILLE CHEROINE SANS EXCEPTION.

***A MES PARENTS, QU'ILS TROUVENT ICI TOUTE MA
GRATITUDE POUR LEUR SOUTIEN TOUT AU LONG DE MES
ETUDES QUE ALLAH ME LES GARDE.***

***JE DEDIE EGALEMENT A TOUS CEUX QUI M'AIMENT ET
SPECIALEMENT A MES ADORABLES***

FRERES ET SŒURS.

MES SŒUR : SOUHILA ET LOUNA

MES CHERS FRERE : YOUCEF ET KHALIL

***A MES COLLEGUES DANS CE TRAVAIL : DJAMILA, NAIMA
ENFIN, JE DEDIE CE TRAVAIL A TOUTE PERSONNE QUI M'A
AIDE DE LE REALISER DE PRES OU DE LOIN SANS
EXCEPTION.***

Dédicaces

***JE REMERCIE TOUT D'ABORD, ALLAH, LE TOUT PUISSANT ET
CLEMENT DE M'AVOIR AIDE A REALISER CE TRAVAIL.***

***JE DEDIE ENSUITE CE FAMEUX TRAVAIL AUX PLUS
EXCEPTIONNELS QUI EXISTENT DANS LE MONDE,
MON ENCADREUR MR ABDI.F. Z, QUI MERITENT TOUS MON
RESPECT ET TRIBUT.***

A TOUTE LA FAMILLE BENZERFA SANS EXCEPTION.

***A MES PARENTS, QU'ILS TROUVENT ICI TOUTE MA
GRATITUDE POUR LEUR SOUTIEN TOUT AU LONG DE MES
ETUDES QUE ALLAH ME LES GARDE.***

***JE DEDIE EGALEMENT A TOUS CEUX QUI M'AIMENT ET
SPECIALEMENT A MES ADORABLES***

FRERES ET SŒURS.

MES SŒUR : SAMIA ET HALIMA

MON CHER FRERE : AISSA ABD EL MALKE

A MES COLLEGUES DANS CE TRAVAIL : NAIMA, NEDJIYA

A MES AMIES : SOUHILA, IKRAM ET RACHA

***ENFIN, JE DEDIE CE TRAVAIL A TOUTE PERSONNE QUI M'A
AIDE DE LE REALISER DE PRES OU DE LOIN SANS
EXCEPTION.***

Dédicaces

***JE REMERCIE TOUT D'ABORD, ALLAH, LE TOUT PUISSANT ET
CLEMENT DE M'AVOIR AIDE A REALISER CE TRAVAIL.***

***JE DEDIE ENSUITE CE FAMEUX TRAVAIL AUX PLUS
EXCEPTIONNELS QUI EXISTENT DANS LE MONDE,
MON ENCADREUR MR ABDI.F. Z, QUI MERITENT TOUS MON
RESPECT ET TRIBUT.***

A TOUTE LA FAMILLE CHENINA SANS EXCEPTION.

***A MES PARENTS, QU'ILS TROUVENT ICI TOUTE MA
GRATITUDE POUR LEUR SOUTIEN TOUT AU LONG DE MES
ETUDES QUE ALLAH ME LES GARDE.***

***JE DEDIE EGALEMENT A TOUS CEUX QUI M'AIMENT ET
SPECIALEMENT A MES ADORABLES***

FRERES ET SŒURS.

MES SŒUR : DENIA

***A MES COLLEGUES DANS CE TRAVAIL : DJAMILA, NEDJIYA
ENFIN, JE DEDIE CE TRAVAIL A TOUTE PERSONNE QUI M'A
AIDE DE LE REALISER DE PRES OU DE LOIN SANS
EXCEPTION.***

Sommaire

REMERCIEMENT

Dédicaces

SOMMAIRE

LISTE DES ABRIVIATIONS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE

RESUME

Partie Bibliographique

I. Chapitre 01

I-1 Définition de hammam sidi Aissa.....	02
I-2 les paramètres physicochimique de hammam sidi Aissa.....	03
I-3 Historique et définition des bactéries thermophiles	03
I-4 Les paramètres influencé sur la croissance des bactéries thermophile.....	04
II-1La niche écologie.....	04
II-2 classification des bactéries thermophiles	05
II-3 BESIONS NUTRITIFS DES BACTERIES THERMOPHILES	05
II-4 Adaptations physiologiques au thermophile.....	06
II-5 Diversité taxonomique et métabolique des bactéries thermophiles.....	06
II-6 les avantages des bactéries thermophiles	06
II-7 Applications biotechnologiques des bactéries thermophiles	07

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Chapitre 01 : matériel et méthodes.....	08
I-1-L'objectif de travail	09
I-2- lieu de travail	09
I-3-présentation de site de prélèvement.....	09
I-4-Isolement et purification des souches thermophiles.....	10
I.4-1Echantillonnage.....	10
I-4-2-Isolement et purification des souches	10
I. Identification des souches purifiées	12
5-1- Caractérisations culturales et morphologie des souches.....	12
I- 1 -Observation macroscopique	12
I-2-Observation microscopique	12
I. Caractérisation physiologique	12
I.5-2-1-Influence du PH.....	12
I.5-2-2-Infuence de la concentration en NaCl.....	12
I.5-3-Caractérisation biochimique	12
I.5-3-1- Recherche de catalase.....	12
I-5-3- 2- Cytochrome oxydase	13
I.5-3-3-Type respiratoire VF.....	13
I.5-3-4-Mannitol mobilité	14

I.5-3-5- Utilisation des sucres TSI.....	14
I.5-3-6-Utilisation de citrate.....	15
I.5-3-7-Recherche de l'ONPG-hydrolase.....	15
I.5-3-8-Production de l'urée indole.....	16
I.5-3-9-Recherche de décarboxylase tests (ODC, LDC, ADH).....	16
I.5-3-10-Caractérisation de type fermentaire (Clarck et Lubs).....	17
I.6-Recherche de l'activité hydrolytique	18
I.6-1- Détermination de l'activité protéolytique.....	18
I-6-1-1-Hydrolyse de caséine.....	18
I-6-2-Détermination de l'activité amylolytique.....	18
I-6-2-1-Hydrolyse de l'amidon.....	18
I-6-3-Détermination de l'activité lypolytique.....	18
I-6-3-1-Hydrolyse des Tween 20 et 80	18
I-6-3-2-Hydrolyse de l'huile d'olive.....	19
Chapitre III : RÉSULTATS & DISCUSSION.....	20
Conclusion	41
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	43
ANNEXES.....	49
Abstract	56

Liste des Tableaux

Tableau 01	Paramètre influencé sur la croissance des bactéries thermophiles	Page n° 03
Tableau 02	classification des bactéries thermophiles	Page n°05
Tableau 03	critères macroscopiques des isolats des bactéries sur milieu M1	Page n°22
Tableau 04	critères microscopiques des isolats des bactéries sur milieu M1	Page n°24
Tableau 05	caractérisation physiologique, l'influence du PH	Page n°25
Tableau 06	caractérisation physiologique, l'influence de la concentration en NaCl.	Page n°27
Tableau 07	caractérisations biochimique des isolats	Page n°29
Tableau 08	caractérisations biochimique	Page n°30
Tableau 09	caractérisations biochimique	Page n°31
Tableau 10	recherche de l'activité hydrolytique	Page n°37

Liste des Figures

Figure : 01	station de hammam thermale sidi Aissa Saïda	Page n°02
Figure : 02	Localisation de source thermophile de sidi Aissa de Saïda	Page n°09
Figure : 03	délutions décimale des bactéries thermophiles.	Page n°10
Figure : 04	Ensemencements des bactéries thermophiles de défèrent dilution.	Page n°11
Figure : 05	Incubation des bactéries thermophiles à 45°c pendant 24 à48 h	Page n°11
Figure : 06	Repiquage des bactéries thermophiles de défèrent dilution	Page n°11
Figure : 07	Observation macroscopique sur les souches étudié	Page n°21
Figure : 08	Observation microscopique sur les souches étudié	Page n°23
Figure : 09	L'influence de pH sur les souches après 24 heures d'incubation à une température de 45°c chez certaines souches	Page n°26
Figure : 10	L'influence de NaCl sur les souches étudié	Page n°28
Figure : 11	Recherche de catalase	Page n°32
Figure : 12	développement des isolats sur VF	Page n°32
Figure : 13	développement des isolats sur mannitol mobilité	Page n°33
Figure :14	développement des isolats sur citrate de Simone	Page n°34
Figure : 15	La recherche de β galactosidase	Page n°34
Figure : 16	développement des isolats sur Urée indole	Page n°35
Figure : 17	décarboxylase des isolats sur LDC, ODC, ADH	Page n°35
Figure : 18	Hydrolyse de caséine des isolats sur milieu qui contienne caséine.	Page n°38
Figure : 19	Hydrolyse de l'amidon des isolats sur milieu qui contienne amidon	Page n°38
Figure : 20	Détermination de l'activité lypolitique des isolats sur milieu qui contienne Tween 20	Page n°39
Figure : 21	Détermination de l'activité lypolytique des isolats sur milieu qui contienne Tween80	Page n°39
Figure : 22	Détermination de l'activité lypolitique des isolats sur milieu qui contienne l'huile d'olive	Page n°40

Liste des abréviations

°C : degré Celsius.

g/l : Gramme par litre.

GLU : glucose.

HCl : chlorure d'hydroxyde.

NaOH : Hydroxyde de Sodium.

pH : potentiel d'hydrogène.

H: Heure.

MAN: Mannitol.

ODC: Ornithine Decarboxylase.

Tween: Polyxéthylènesorbitanemonooléate.

ONPG: Orto-nitro-phényl-β-D- galactopyrannoside.

ADH : Arginine Dihydrolase.

EDS: Eau distillée stérile.

TSI: Triple Sugar Iron.

Lac: Lactose.

LDC: Lysine Décarboxylase.

RM : Rouge de méthyle.

VP : Vogues Proskauer.

CIT : citrate.

CAT : catalase.

Ox : oxydase.

NaCl : Chlorure de sodium

INTRODUCTION

L'Algérie a fait preuve de sa richesse en eaux thermales et minérales depuis longtemps.

Les eaux thermales sont des eaux dont la température est supérieure à celle de valeur régionale. On distingue les eaux thermales de basse enthalpie (basse température) et les eaux thermales de haute enthalpie, La définition des eaux thermales s'est enrichie par la suite d'un aspect thérapeutique « Une eau thermale a une température élevée à la source et des propriétés thérapeutiques (Le petit robert.1994) ».

Avec plus de 200 sources thermales réparties sur tout le territoire algérien le thermalisme peut être un vecteur de développement local pour un bon nombre de régions du pays. Il est d'ailleurs une activité permanente qui attire de nombreux touristes, notamment des visiteurs nationaux et peut-être étrangers si les conditions d'accueil et de soins sont réunies.

Les bactéries thermophiles ont été reçu l'attention des microbiologistes et des biochimistes depuis le premier isolement bactérien thermophile par Miquel (1888) depuis l'eau thermale grâce à ses capacités de synthétiser plusieurs métabolites thermostables.

Pour ce faire, l'Algérie doit prendre exemple sur les pays qui ont parfaitement réussi dans le domaine, La commune de Sidi Aissa à la wilaya de Saida dispose d'une eau de source de meilleure qualité minérale et susceptible d'être orientée à une large consommation humain microbiologiquement saine et protégée contre les risques de pollution.

L'eau de source prélevée dans la région de Hammam Sidi Aissa est favorable pour traiter les affections rhumatismales chroniques et certaines maladies de la peau (Toudert 2006)

Le principal objectif de ce travail est l'isolement, identification et caractérisation des bactéries thermophiles isolées à partir de hammam sidi Aissa de wilaya Saïda.

Ce travail est divisé en trois parties : une synthèse bibliographique des récentes connaissances sur le sujet, une partie expérimentale et une partie résultats et discussion. A la fin des conclusions et perspectives sont retirées de ce travail.

Chapitre I :

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Hamмам sidi Aissa se situe non loin de la source de Hammam Rabi à la wilaya de Saida, à quelque 5 km vers le Nord-ou est un forage a été implanté en 1969. (Chibani et Kaddouri, 2013).

Le forage cité précédemment est artésien avec un débit 7.5 L/s. Leur coordonnées UTM sont : 31241074 E et 3872 221 N avec une Altitude de 640 m ; et géographiques sont :34°57'43'' N et 00°09'51'' E. Offre à ses visiteurs des caractéristiques thérapeutiques grâce à ses eaux thermales sortant à une température de 44 à 50°C avec un débit de 7 l/s. Le Hammam compte 2 salles de bains (H/F) avec 54 cabines (Lakhdari et Bouacha, 2016).



Figure: 01 Station thermale de Sidi Aissa (source: Google Maps, 2021).

I.2 Les paramètres physico-chimiques de l'eau thermale de hammam Sidi Aissa

Tableau 01 : Les paramètres physico-chimiques de l'eau thermale de hammam Sidi Aissa

Paramètre physicochimique	Les valeurs
Température	47°C
Conductivité	3530 µS/cm
Potentiel-hydrogène	7,17
Résidu sec	2294.5mg/L
Minéralisation important	2677.66 mg/L

I.3 Historique des bactéries thermophiles

Généralement, on s'attend à ce que les microorganismes thermophiles croissent dans des environnements chauds comme les sources géothermales, Les bactéries thermophiles ont été observées pour la première fois en 1879 dans l'eau de la seine. Il fallut cependant attendre jusqu'en 1898.

Plusieurs définitions ont été proposées pour définir le thermophile. La plus reconnue est celle qui a été proposée par Thomas Brock à la fin des années soixantes. Un thermophile est un être vivant dont la température optimale de croissance se situe au-dessus de 60 °C. Une définition plus pratique et plus large a été proposée par Karl, (2010)

et Michael *et al.*, (2007) est qualifié d'organismes thermophiles, tous les êtres vivants se développant à des températures supérieures à 45 °C.

Selon Panda *et al.*, (2013), Les bactéries thermophiles sont des microbes qui habitent principalement dans les sources chaudes, vivent et survivent à des températures élevées, elles ont été moins explorées en raison de difficultés d'isolement et de maintien en culture pure.

I.4 Les paramètres influençant sur la croissance des bactéries thermophiles

1-**TEMPERATURE** : est un paramètre vital pour la croissance microbienne, les bactéries thermophiles sont les microbes qui vivent et survivent à des températures comprises entre 45°C et 122° C. (Karine, et al., 2014).

2-**pH** : la valeur du pH est influencée sur les bactéries thermophiles, la plupart se développent à un pH proche à 7 de neutralité entre 6.5 à 7,4. (Chibani et Kaddouri, 2014).

Certaines bactéries thermophiles sont développées dans des milieux acides de pH situé entre 0 à 4 qui appelées acidophiles et autre bactéries thermophiles se développent dans des milieux basiques de pH supérieur 9 qui appelé alcalophiles. (Morozkina *et al.*, 2010 ; Martins *et al.*, 2001).

3-**Salinité** : généralement du chlorure de sodium NaCl ou bien la concentration de sel, ce paramètre influence sur la croissance des bactéries. (Larbi, 2016).

II.1 Niches écologique des thermophiles

Les biotopes les plus communs dans lesquels vivent les thermophiles sont d'origine géothermique généralement associés à des zones tectoniques actives mais on les trouve également dans des biotopes chauds artificiels habitent les systèmes thermique (Ferrera et Reysenbach, 2007). Et naturels qui distribués entre les sites terrestres les sources hydrothermales (Oshima et Moriya, 2008).

II.2 Classification des bactéries thermophiles

Les thermophiles sont généralement séparés en trois catégories selon leurs températures cardinales de croissance :(Madigan et Martinko, 2007 ; Alain *et al.* 2010).

Tableau n° 02 : Classification des bactéries thermophiles

[Tableau adapté de (Seckbac,2006 ; Capece *et al.* ,2013 ; Tse et Ma 2016 et Kumar *et al.* , 2018)]

Classification	La température
Les thermophiles	Entre 30-70°C
thermophiles extrêmes	Entre 55-85°
les hyper thermophiles	Entre 75-113°C

II.3- BESIENS NUTRITIFS DES BACTERIES THERMOPHILES

Les besoins nutritifs des bactéries thermophiles sont différents à ceux des bactéries mésophiles. En effet plusieurs auteurs ont noté un besoin particulier de vitamines tel que :

- La vitamine B1 (thiamine).
- La vitamine B2 (riboflavine).
- Acides aminées tels l’histidine et la Méthionine.
- Calcium et de magnésium pour stimuler ou permettre la croissance des bactéries (Surucu, 1999).

II.4 Adaptations physiologiques au thermophile

La vie à haute température est rendue possible par un certain nombre de mécanismes adaptatifs et/ou de molécules que l'on retrouve uniquement chez les thermophiles. Analyse de biomolécules importantes chez les bactéries thermophiles a révélé des différences structurales subtiles dans les protéines, les acides nucléiques et les lipides (Alain et *al.* 2010).

II .5 Diversité taxonomique et métabolique des bactéries thermophiles

Les micro-organismes thermophiles possèdent des caractéristiques physiologiques et métaboliques très diverses incluent des phototrophes, des chimiolithoautotrophes, des autotrophes et des hétérotrophes. (Itoh et Ino,2013 ; Madigan et *al.*,2014).

Le premier groupe les bactéries chimiolithoautotrophes est représenté par l'ordre des Aquificales, répandu au niveau des sources thermales (Nakagawa et *al.* 2005). Le deuxième sont des espèces thermophiles phototrophes prospérant à des températures relativement élevées (jusqu'à 74°C). (Ferrera et Reysenbach, 2007). En fin des groupes Bactéries thermophiles hétérotrophes présenté dans la plupart des environnements à températures modérément élevées. Très souvent, ces bactéries sont également acidophiles ou alcalophiles (Ferrera et Reysenbach ,2007).

II. 6 Avantage des bactéries thermophiles

Les micro-organismes thermophiles ont suscité beaucoup d'intérêt dans le domaine de la biotechnologie (Bouchée, 2016) parmi les avantages de l'utilisation de bactéries thermophiles sont :

- Inactivation ou élimination des micro-organismes contaminants / pathogène mésophiles.
- Production de macromolécules et métabolites thermostables.
- Facilité de récupération des produits catalysent (Krahet et *al.* 1996 ; Kumar, 2001).
- Récupération directe des produits volatils.
- Capacité de production des substances bioactives comme les enzymes (Aannizet *al.* 2015).

II.7 Applications biotechnologiques des bactéries thermophiles

On peut distinguer deux types d'applications différentes :(Quérellou et Guézennec, 2010 ; Rekadwad et Gonzalez, 2018).

- La première repose sur l'utilisation directe des organismes C'est le cas en particulier pour les applications liées à la bioremédiation et à la biolixiviation.
- Le second type d'applications repose sur l'utilisation des biomolécules issues des extrêmophiles. Ce sont les enzymes, mais aussi les protéines, les lipides, les polymères, et une grande diversité de métabolites secondaires.

Chapitre II :

MATÉRIEL & METHODES

I. Matériel et Méthodes

I-1-L'objectif de travail

- Notre propose est pour faire un isolement et une identification des souches thermophiles dans la zone thermale de hammam sidi Aissa de Saïda.

➤ I-2- Lieu de travail

- Ce travail a été réalisé au laboratoire pédagogique de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université IBN KHALDOUNE et laboratoire de reproduction des animaux de la ferme, pour une durée de 4mois allant de 2mars à 2juin 2021.

I-3-Présentation de site de prélèvement

Le prélèvement de l'échantillon a été réalisé à partir de la source thermale de Hammam sidi Aissa de la willaya de Saïda, Algérie.

Cette source est située non loin de la source de Hammam Rabi à la wilaya de Saida, à quelque 5 km vers le Nord-ouest un forage a été implanté en 1969. (Chibani et Kaddouri, 2013). Le forage cité précédemment est artésien avec un débit 7.5 L/s. Leur coordonnées UTM sont : 31241074 E et 3872 221 N avec une Altitude de 640 m ; et géographiques sont :34°57'43'' N et 00°09'51'' E, Offre à ses visiteurs des caractéristiques thérapeutiques grâce à ses eaux thermales sortant à une température de 44 à 50°C avec un débit de 7 l/s.



Figure02 : Localisation de source thermophile de sidi Aissa de Saïda (Google ...Maps2021)

I-4-Isolement et purification des souches thermophiles

I.4-1Echantillonnage

Les échantillons d'eau ont été prélevés en mois de mars 2021 à partir de 5 points. Les échantillons sont prélevés à 10-20 cm de la surface dans des flacons stériles de 250ml et transportés dans une glacière à 4°C.

I-4-2-Isolement et purification des souches

❖ Mode opératoire

➤ Dilution décimale

Une série de dilutions décimales (10^{-1} jusqu'aux 10^{-5}) a été réalisée à partir de la solution mère dans l'eau de source thermale stérile.

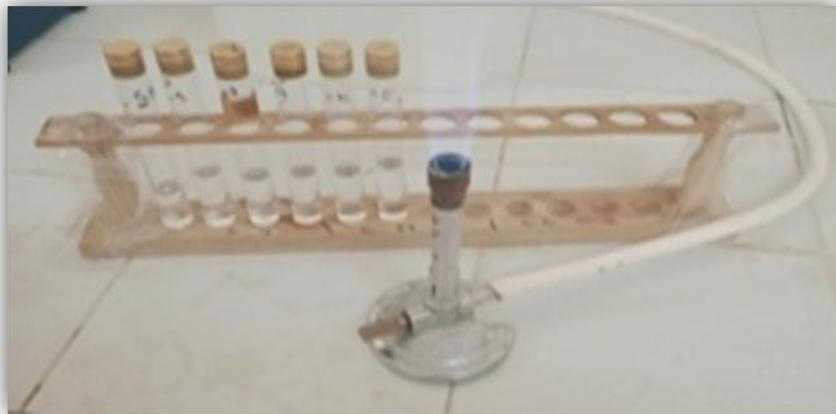


Figure 03 : Dilutions décimales des bactéries thermophiles

➤ Ensemencement

- Prélever aseptiquement 1 ml de chaque dilution et le déposer dans des boîtes de Pétri.
- Faire fondre le milieu d'isolement. Lorsqu'il est refroidi à 45°C, le couler aseptiquement dans les boîtes de Pétri contenant les inocula dilués.
- Agiter doucement les boîtes ensemencées par des mouvements circulaires et en forme de huit afin d'assurer un mélange homogène sans faire les bulles d'air.
- Laisser les boîtes solidifier.
- Incuber les boîtes à 45 °C jusqu'à l'apparition des colonies (24 à 72heures).



Figure04 : Ensemencement des bactéries thermophiles



Figure05 : Incubation des bactéries thermophiles à 45°C pendant 24 à 48 h

➤ **Repiquage**

- De chaque boîte, environ une dizaine des colonies à différents aspects macroscopiques sont sélectionnées et purifiées par repiquages successifs sur le même milieu d'isolement.
- Les souches pures sont conservées à 4 °C dans les mêmes milieux d'isolement additionnés de 3% de glycérol.



Figure06 : Repiquage des bactéries thermophiles

I-5-Identification des souches isolées

I-5-1-Caractérisation culturelle et morphologique des souches

I-5 -1-1-Observation macroscopique

C'est une description directe faite sur boîtes d'isolement, elle permet de déterminer l'aspect macroscopique des colonies (forme, aspect, couleur, contour, taille, etc). L'identification macroscopique des bactéries se fait après leur croissance sur un milieu solide M1.

I-5 -1-2-Observation microscopique

L'observation microscopique s'effectue à l'aide d'un microscope optique après une coloration de Gram (X 100 à l'immersion).

La coloration de Gram permet de classer la plupart des bactéries en 2 groupes par rapport à la proportion de peptidoglycanes contenant dans les membranes : les bactéries à Gram positif qui sont riches en peptidoglycanes et pauvres en lipides et l'inverse pour les bactéries à Gram négatif.

I-5-2-Caractérisation physiologique

L'influence de la concentration en NaCl, le pH, la caséine, l'amidon, Tween20, Tween 80 et l'huile d'olive sur la croissance est déterminée sur un milieu solide (M1).

I-5-2-1-Influence du pH

L'influence du pH sur la croissance a été déterminée par la culture des souches sur milieu solide ajusté à des pH allant de 4 à 9. L'incubation a été faite à 45°C pendant 48 heures.

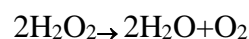
I-5-2-2-L'influence de la concentration en NaCl

L'évaluation de la croissance des souches en fonction de la salinité a été déterminée par la culture des souches sur le milieu M1 contenant des concentrations en NaCl de 0 %, 5%, 9% et 12%. L'incubation a été faite à 45°C pendant 48 heures.

I-5-3- Caractérisation biochimique

I-5-3- 1-Recherche de catalase

Cette enzyme empêche l'accumulation d'H₂O₂, dont l'action serait létale pour la cellule bactérienne, selon la réaction suivante :



L'oxygène libéré est dégagé sous forme gazeuse (Marchal *et al.*, 1987).

Mode opératoire

- Sur une lame propre et sèche, déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes.
- A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien.
- Observer immédiatement.

Lecture

Apparition des bulles expliquée par dégagement gazeux de dioxygène : catalase +

Pas de bulles : catalase (-).

I-5-3- 2- Cytochrome oxydase**Principe**

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

Mode opératoire

Une quantité suffisante de culture est déposée sur le disque imbibé d'eau distillée. Une couleur bleue violacée se manifeste en quelques minutes en cas de réaction positive (Joffin et Leyral, 2006).

I-5-3-3-Type respiratoire VF**Principe**

Le type respiratoire est caractérisé sur le milieu solide Viande Foie. L'ensemencement de chaque souche est doublé sur deux tubes dont l'un des deux, l'huile de vaseline est ajoutée sur le milieu. La lecture se fait après 24h d'incubation. L'apparition des colonies indique un résultat positif.

Lecture

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

I-5-3-4-Mannitol mobilité

Principe

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

Mode opératoire

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

Lecture

- *Fermentation du mannitol*

- La lecture de l'utilisation du mannitol est possible grâce à la présence d'un indicateur de pH, le rouge de phénol.

L'utilisation du mannitol provoque l'acidification de milieu qui peut ainsi être révélée par le virage de l'indicateur de pH du rouge vers le jaune ; la bactérie est dite mannitol positif (+).

- Si la couleur reste rouge cela indique que la bactérie ne fermente pas le mannitol ; elle est dite mannitol négatif (-).

- *La mobilité*

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

I-5-3-5-Utilisation des sucres TSI

Principe

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

Mode opératoire

- ✓ Ensemencer les souches isolées dans le milieu de TSI par piquer centrale puis ensemencer la pente par des stries.
- ✓ Incuber les tubes à 45°C pendant 24h.

Lecture

- La fermentation du lactose / saccharose sur la pente qui se traduit par virage au jaune.
- La présence de gaz qui se manifeste par le décollement du culot et/ou la présence de bulle d'air.
- La production de H₂S qui se traduit par une coloration noire.

I-5-3-6-Utilisation de Citrate

Principe

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone ; le citrate de sodium.

Seules les bactéries possédant une citrate-perméase sont capables de se développer sur ce milieu.

L'utilisation de citrate par les bactéries peut se faire de façons très diverses ce qui, suivant le cas, se traduira par une alcalinisation du milieu ou une acidification plus ou moins importante.

Mode opératoire

- La pente du milieu est ensemencée par une strie longitudinale au moyen d'une anse qui contient la suspension bactérienne.
- Incuber à 45°C pendant 5 jours.

Lecture

- Bactérie à citrate positive : culture avec alcalinisation du milieu ; virage de l'indicateur au bleu.
- Bactérie à citrate négative : le milieu reste vert.

I-5-3-7-Recherche de L'ONPG-hydrolase

Principe

Il s'agit d'une recherche complémentaire à l'étude de la dégradation du lactose, souvent encore appelée recherche de la β galactosidase (Marchal, 1987) .

Mode opératoire

- Ajouter une suspension dense dans 0,5ml d'eau physiologie.
- Avec une pince flambée et refroidie déposer un disque d'ONPG.
- Mettre le tout au bain-marie à 37°C.
- Examiner les tubes après 15min à 30min.

N.B. : Ne pas prolonger les lectures au-delà de 24h car la majorité des réactions positives sont observées entre 15min et 30min. (Marchal *et al.*, 1987).

Lecture

- Le test ONPG est positif lorsque la suspension de couleur en jaune.
- La réaction ONPG négative : pas de coloration (Marchal *et al.* 1987).

I-5-3-8-Production de l'urée indole

Principe

L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée, Lors de l'hydrolyse de l'urée par l'uréase, elle donne du carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu.

A) -Production de l'uréase

- Ensemencer le milieu de l'urée indole par une culture bactérienne de 18h.
- Incuber à 37°C pendant 24 heures.

Lecture

- *Uréase positive : virage de l'indicateur du jaune au rouge violacé ou au rose rouge.
- *Uréase négative : pas de changement de couleur. (Marchal *et al.*, 1987)

B) -Production de l'indole

- Après incubation en ajoute quelque goutte du réactif kovacs.

Lecture

- La production de l'indole se traduit par la manifestation d'un anneau rouge.

C) -Recherche de tryptophane désaminase (TDA)

Principe

La désaminase agit sur le L-tryptophane en donnant l'acide indole-pyruvique ; L'acide indole-pyruvique donne avec le perchlorure de fer une coloration brune (Marchal *et al.*, 1987).

Mode opératoire

- Soit un milieu urée-indole, avec une suspension bactérienne à identifier (culture de 18heure).
- Incuber à 37° C Pendant 24h.
- Après incubation ajoutée le réactif TDA.

Lecture

- Résultat TDA⁺ : coloration brun rouge.
- Résultat TDA⁻ : coloration jaune orangé.

I-5-3-9- Recherche de décarboxylase tests (ODC, LDC, ADH).

Principe

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

Mode opératoire

- Dans des tubes stériles ajoutée les milieux Moëller, LDC, ODC et ADH.
- Ensemencer la souche bactérienne testée (culture de 18h).
- Ajouter l'huile de paraffine pour crée l'anaérobiose.
- Incuber à 37°C pendant 24h.

Lecture

- Résulta négatif : il ya un virage de couleur en jaune.
- Résultat positif : les milieux restent violets.

I-5-3-10-Caractérisation de type fermentaire (Clarck et Lubs)**A) -Réaction au rouge de méthyle (RM)**

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

B) -Réaction de vogues proskauer (VP)

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

Mode opératoire

- Mettre le milieu Clarck et Lubs dans des tubes.
- Ensemencer le milieu par la suspension bactérienne a étudiée.
- Incuber les tubes à 37°C pendant 24h.
- Après incubation, partager le milieu qui contienne la souche analysée en deux séries.
- Ajoutée quelque goutte de VP 1 et VP2 dans la première série.
- Ajoutée 2à 3 goutte de RM dans la deuxième série.

Lecture

- Pour *la réaction de VP* la lecture doit être immédiate :
 - ✓ Si la coloration est rouge : VP+
 - ✓ Si la coloration est jaune : VP-.
- Pour*la réaction RM*
 - ✓ Si la coloration est rouge : RM+

✓ Si la coloration est jaune : RM-.

I-6-Recherche de l'activité hydrolytique

I-6-1-Détermination de l'activité protéolytique

I-6-1-1-Hydrolyse de caséine

Principe

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

I-6-2-Détermination de l'activité amylolytique

I-6-2-1-Hydrolyse de l'amidon

Principe

L'activité amylolytique est examinée en ajoutant 1% (p/v) d'amidon soluble au milieu de base. L'incubation est effectuée pendant 1 à 3 jours et la lecture se fait par inondation des boîtes avec une solution de lugol. La présence de zones claires autour de l'ensemencement témoigne de la production d'amylases (Gordon *et al.* 1973).

I-6-3-Détermination de l'activité lypolytique

L'estérase est recherchée par le test d'hydrolyse des Tween 20 et 80, le test d'hydrolyse de l'huile d'olive permet la recherche de lipase.

I-6-3-1-Hydrolyse des Tween 20 et 80

Les Tween 20 ou 80 stériles sont rajoutés à une concentration de 1% (v/v) au milieu de base stérile en surfusion. Les boîtes de Pétriensemencées sont incubées pendant 1 à 3 jours. Une lecture positive est traduite par l'apparition de zones claires autour des colonies productrices de lipase (Sierra, 1957).

I-6-3-2-Hydrolyse de l'huile d'olive

- Le milieu de base est stérilisé et additionné de 2,5% (v/v) d'huile d'olive stérilisé séparément. Le mélange est homogénéisé par agitation. Après ensemencement en stries et incubation pendant 1 à 3 jours. Une lecture positive (production de l'estérase) est notée lorsqu'il y a apparition des zones translucides autour des stries (Sigurgísladóttir *et al.*, 1993).

Chapitre III :

RÉSULTATS & DISCUSSION

I-5-Identification des souches isolées

Nous avons isolée 86 souches thermophiles à partir d'eau thermale de Sidi Aissa à wilaya de Saida, mais nous avons réalisée l'identification de 20 souches selon la disponibilité des produits.

I-5-1-Caractérisation culturelle et morphologique des souches

I-5 -1-1-Observation macroscopique

L'aspect des colonies sur le milieu M1 après une incubation de 24h permet de distinguer différents types de colonies :

Nous avons observé des colonies filamenteuses, bouclées, rhizoïdes, rondes, ondulés et lobés ; avec des tailles déférentes (petite, moyenne ou grande).

Nous avons constaté que 16 souches isolées présentent un aspect crémeux alors que 4 souches sont un aspect rugueux.

Concernant le contour, nous avons remarqué que toutes les souches possèdent un contour irrégulier sauf la souche S 08.

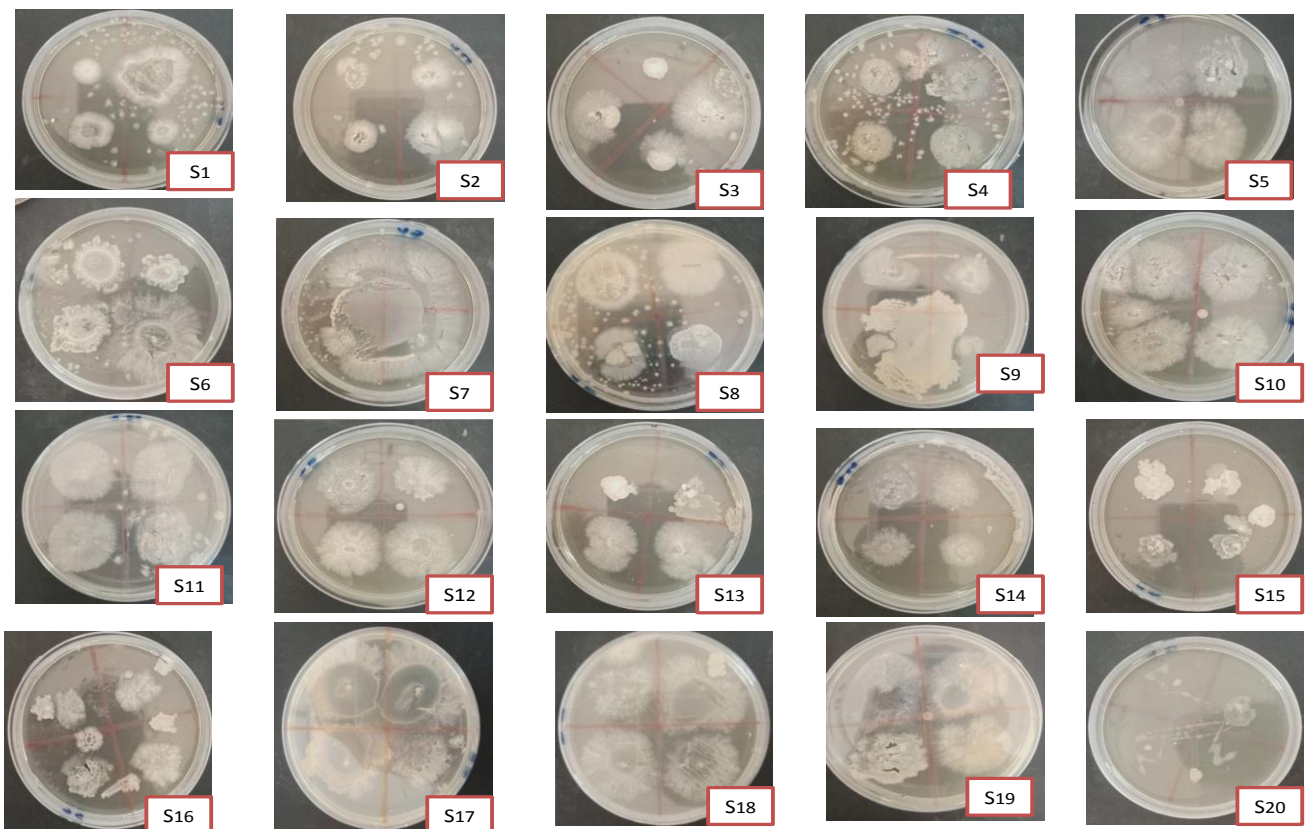


Figure07 : observation macroscopique sur les souches étudiées

Tableau03 : Critère macroscopique des isolats bactériens sur milieu M1

Isolat	Forme	Taille	Aspect	couleur	Contour
S1	Ronde	Grand	Cré	blanche	IR
S2	Filamenteuse	Moy	Cré	blanche	IR
S3	Filamenteux	Grand	Cré	Beige	IR
S4	Filamenteuse	Grand	Cré	Beige	IR
S5	Filamenteuse	Grand	Cré	blanche	IR
S6	Bouclé	Grand	Cré	Beige	IR
S7	Rhizoïde	Grand	Rug	blanche	IR
S8	Rond	Moy	Cré	Beige	Rég
S9	Filamenteuse	Moy	Cré	Beige	IR
S10	Bouclé	Grand	Cré	blanche	IR
S11	Filamenteuse	Grand	Rug	Beige	IR
S12	Filamenteuse	Grand	Cré	Beige	IR
S13	Filamenteux	Moy	Cré	Beige	IR
S14	Filamenteux	Moy	Cré	blanche	IR
S15	Ondulé	Petit	Cré	Beige	IR
S16	Lobé	Moy	Rug	Beige	IR
S17	Filamenteux	Grand	Rug	blanche	IR
S18	Filamenteux	Grand	Cré	Beige	IR
S19	Filamenteuse	Grand	Cré	Beige	IR
S20	Ondulé	Petit	Cré	Beige	IR
Cré=crémeux, Rug=rugueux, Moy=moyen, IR=irrégulier, /ré g=régulier					

I-5 -1-2-Observation microscopique

Après une incubation des souches à 45°C pendant 24 heures, nous avons effectuées une observation microscopique (grossissement X 100 à immersion).

L'observation a montrée que les bactéries $S\{1,2,5,7, 8,9,10,11,15,17,19,20\}$ sont des cocci , alors que $S\{4,6, \}$ sont des bacilles et $S\{3,12 ,13 ,14 ,16 ,18 \}$ sont des coccobacille. (Figure N°08).

Concernant le Gram, nous avons constaté que (11) souches ont un Gram positif et (09) souches ont un Gram négatif.

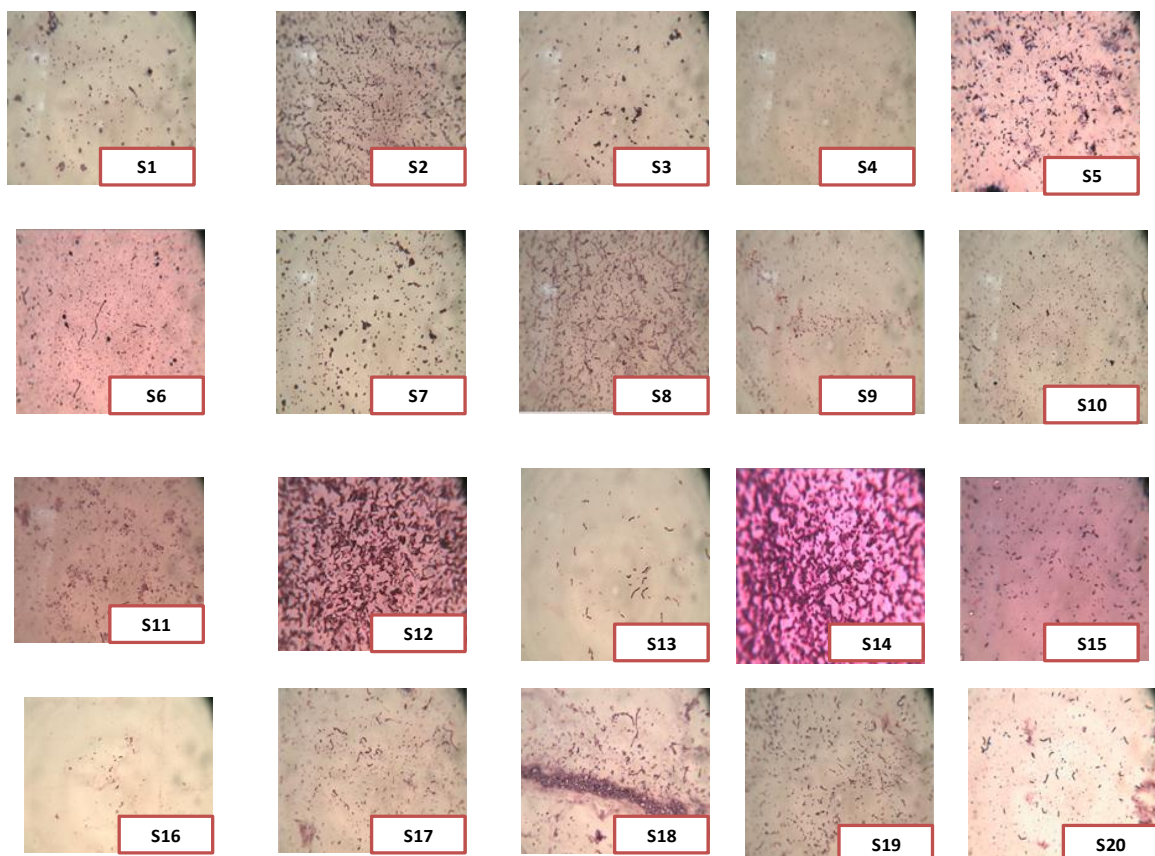


Figure 08 : observation microscopique sur les souches étudiées au microscope photonique à GX100

Tableau 04: Critère microscopique des isolats des bactéries sur milieu M1

<i>Isolat</i>	<i>Gram</i>	<i>Regroupe</i>	<i>Forme</i>
S1	+	Isolé	Cocci
S2	+	Isolé	Cocci
S3	+	En chaine	Cocobacile
S4	-	Enchaine	Bacile
S5	-	Isolé	Cocci
S6	+	Isolé	Bacile
S7	-	Isolé	Cocci
S8	+	Isolé	Cocci
S9	+	En chaine	Cocci
S10	-	En chaine	Cocci
S11	-	Isolé	Cocci
S12	-	En chaine	Cocobacile
S13	+	En chaine	Cocobacile
S14	-	En chaine	Cocobacile
S15	+	Lang chaine	Cocci
S16	+	Isolé	Cocobacile
S17	-	Isolé	Cocci
S18	+	En chaine	Cocobacile
S19	+	Lang chaine	Cocci
S20	-	Isolé	Cocci
Coloration violet ; gram (+) Coloration rose ; gram (-)			

I-5-2-Caractérisation physiologique

Les spectres de salinité et de pH enregistrés sont présentés dans les tableaux (05) et (06).

I-5-2-1-Influence du pH

Les résultats de l'influence de pH sur les souches isolées sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau05 : Caractérisation physiologique, Influence du pH

pH	pH=04	pH=09
S1	-	+
S2	-	+
S3	-	+
S4	-	+
S5	-	+
S6	-	+
S7	-	+
S8	-	+
S9	-	+
S10	-	+
S11	-	+
S12	-	+
S13	-	+
S14	-	+
S15	+	-
S16	+	-
S17	+	-
S18	+	-
S19	+	-
S20	+	-
Le développement des bactéries (+) Pas de croissance des bactéries (-)		

D'après ces résultats, nos isolats supportent une gamme de pH de croissance relativement large (4 à 9) avec un optimum $\approx 7,5$.

Cependant, les souches (15,16,17,18,19,20) sont des acidophiles car elles sont développées à un pH de 4, alors que les souches (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14) sont des bactéries alcalophile.

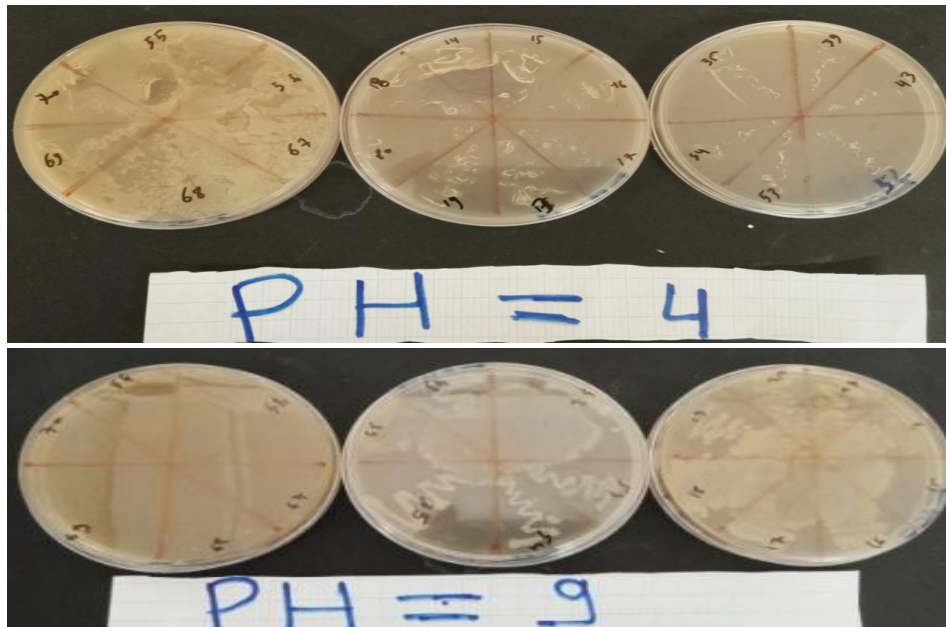


Figure 09 : L'influence de pH sur les 20 souches étudiées après 24 heures d'incubation à une température de 45°C isolées.

I-5-2-2-L'influence de la concentration en NaCl

Les résultats d'influence de NaCl sur les souches isolées sont présentés dans le tableau (06).

Tableau 06 : Caractérisation physiologique, L'influence de la concentration en NaCl

<i>Isolat</i>	<i>NaCL=0%</i>	<i>NaCL=5%</i>	<i>NaCL=9%</i>	<i>NaCL=12%</i>
<i>S1</i>	+	+	+	+
<i>S2</i>	+	+	+	+
<i>S3</i>	+	+	+	+
<i>S4</i>	+	+	+	+
<i>S5</i>	+	+	+	+
<i>S6</i>	+	+	+	+
<i>S7</i>	+	+	+	+
<i>S8</i>	+	+	+	+
<i>S9</i>	+	+	+	+
<i>S10</i>	+	+	+	+
<i>S11</i>	+	+	+	+
<i>S12</i>	+	+	+	+
<i>S13</i>	+	+	+	+
<i>S14</i>	+	+	+	+
<i>S15</i>	+	+	+	+
<i>S16</i>	+	+	+	+
<i>S17</i>	+	+	+	+
<i>S18</i>	+	+	+	+
<i>S19</i>	+	+	+	+
<i>S20</i>	+	+	+	+
<i>La croissance des bactéries (+)</i>				

Les souches étudiées peuvent se développer dans un intervalle de salinité varie de [0 %-12%]; donc nous constatant que sont des bactéries halotolérantes qui acceptent des fortes concentrations en sels mais ne sont pas obligatoires pour leurs croissances.

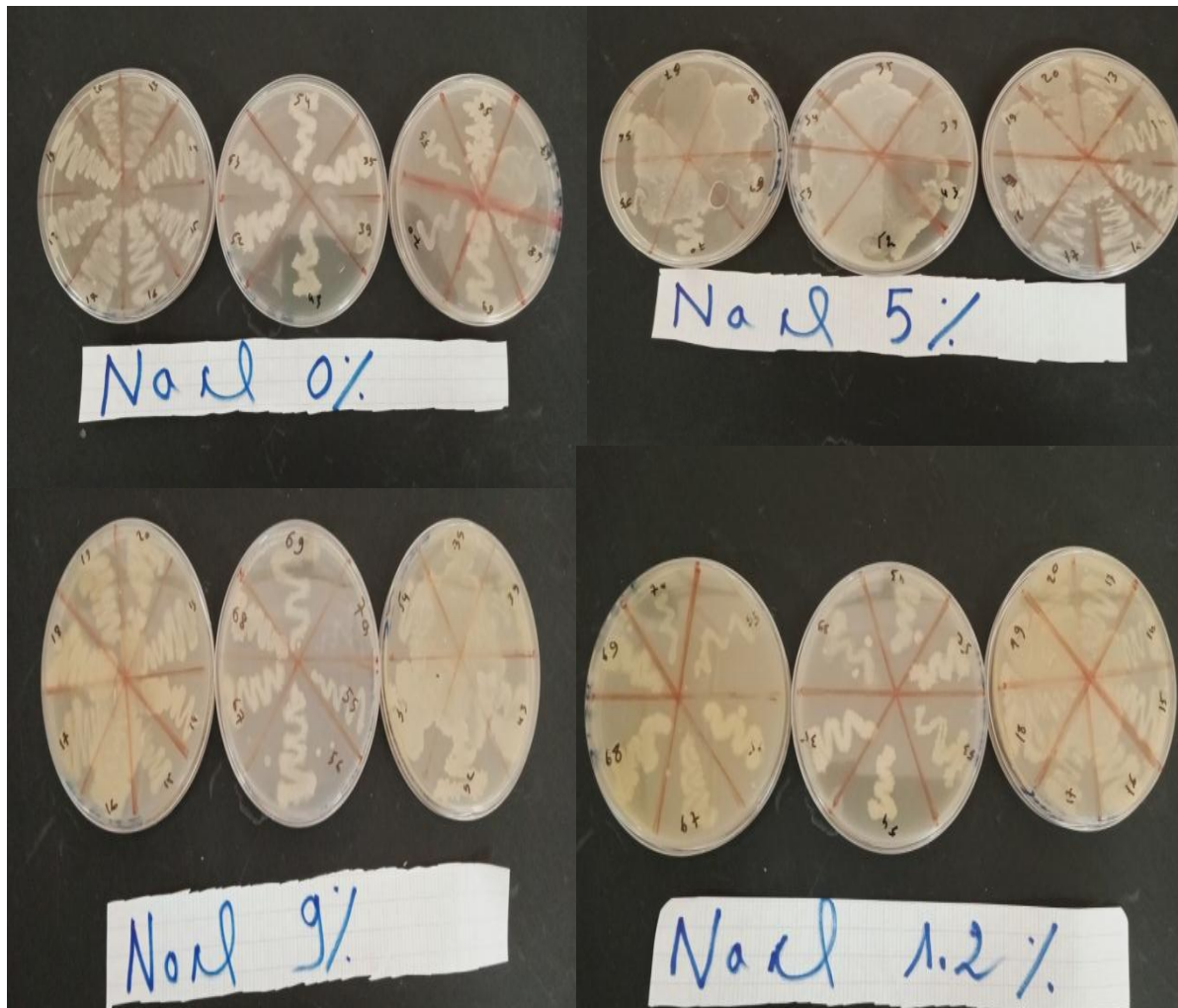


Figure10: L'influence de NaCl sur les souches étudiées

I-5-3-Caractérisation biochimique

Les résultats des différents caractères biochimiques des souches thermophiles sont réunis dans les **tableaux** suivants :

Tableau : Caractérisation biochimique des isolats

Tableau : Caractérisation biochimique des isolats

Tableau : Caractérisation biochimique des isolats

Tableau 07 : Caractérisation biochimique des isolats

<i>Isolat</i>	<i>VF</i>	<i>RMVP</i>		<i>Mannitol Mobilité</i>	
	<i>Avec l'huile de paraffine</i>	<i>RM</i>	<i>VP</i>	<i>Man</i>	<i>Mob</i>
<i>S1</i>	<i>Aéro anaérobie</i>	-	-	+	<i>Mob</i>
<i>S2</i>	<i>Anaérobie stricte</i>	+	-	+	<i>Mob</i>
<i>S3</i>	<i>Aéro anaérobie</i>	-	-	+	<i>Mob</i>
<i>S4</i>	<i>Aéro anaérobie</i>	+	-	+	<i>Mob</i>
<i>S5</i>	<i>Aéro anaérobie</i>	-	-	+	<i>Imob</i>
<i>S6</i>	<i>Aérobie stricte</i>	+	-	+	<i>Mob</i>
<i>S7</i>	<i>Aéro anaérobie</i>	+	-	+	<i>Mob</i>
<i>S8</i>	<i>Aéro anaérobie</i>	+	-	+	<i>Mob</i>
<i>S9</i>	<i>Aérobie</i>	-	-	+	<i>Mob</i>
<i>S10</i>	<i>Aéro anaérobie</i>	+	-	+	<i>Mob</i>
<i>S11</i>	<i>Aéro anaérobie</i>	+	-	+	<i>Mob</i>
<i>S12</i>	<i>Aéro anaérobie</i>	-	-	+	<i>Imob</i>
<i>S13</i>	<i>Aéro anaérobie</i>	-	-	+	<i>Mob</i>
<i>S14</i>	<i>Aéro anaérobie</i>	-	-	+	<i>Imob</i>
<i>S15</i>	<i>Aéro anaérobie</i>	+	-	+	<i>Mob</i>
<i>S16</i>	<i>Aérobie stricte</i>	+	-	+	<i>Imob</i>
<i>S17</i>	<i>Aéro anaérobie</i>	+	-	+	<i>Imob</i>
<i>S18</i>	<i>Aéro anaérobie</i>	+	-	+	<i>Imob</i>
<i>S19</i>	<i>Aérobie</i>	-	-	+	<i>Imob</i>
<i>S20</i>	<i>Aéro anaérobie</i>	-	-	+	<i>Mob</i>

RM ; virage ment de couleur vers le rouge (+) /couleur jaune (-)
VP ; pas de changement de couleur (-)
Mobile=mob/immobile=Imob
Fermentation de mannitol virage ment de couleur en jaune(+)

Tableau 08 : caractérisation biochimique

<i>Isolat</i>	<i>Catalase</i>	<i>Oxydase</i>	<i>ONPG</i>	<i>Citrate de Simonne</i>
<i>S1</i>	-	-	-	-
<i>S2</i>	-	-	-	-
<i>S3</i>	-	-	-	+
<i>S4</i>	-	-	-	-
<i>S5</i>	-	-	-	+
<i>S6</i>	-	-	-	-
<i>S7</i>	-	-	-	-
<i>S8</i>	-	-	-	+
<i>S9</i>	-	-	-	-
<i>S10</i>	-	-	-	+
<i>S11</i>	-	-	-	+
<i>S12</i>	-	-	-	-
<i>S13</i>	-	-	-	-
<i>S14</i>	-	-	-	+
<i>S15</i>	-	-	-	-
<i>S16</i>	-	-	-	-
<i>S17</i>	-	-	-	+
<i>S18</i>	-	-	-	-
<i>S19</i>	-	-	-	+
<i>S20</i>	-	-	-	-
<p><i>Citrate de Simonne ; pas de changement de couleur (-) /Couleur bleu (+)</i> <i>ONPG : couleur jaune (+) /pas de changement de couleur (-)</i> <i>Catalase ; pas de bulle d'air(-)/Oxydase ; pas de changement de couleur (-)</i></p>				

Tableau 09 : caractérisation biochimique

Isolat	TSI			Décarboxylase			Urée Indole		
	F.des glucide	CO ₂	H ₂ S	LDC	ODC	ADH	Uréase	Indole	TDA
S1	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S2	+	-	-	+	+	+	-	+	+
S3	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S4	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S5	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S6	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S7	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S8	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S9	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S10	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S11	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S12	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S13	-	-	-	+	+	+	-	+	+
S14	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S15	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S16	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S17	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S18	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S19	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S20	+	+	-	+	+	+	-	+	+

La fermentation des glucides ; couleur jaune (+) /CO₂ Les bulle d'air (+) /H₂S ; pas de coloration noir (-) /TDA+ ; Brune rouge/Indole+ ; Anaux rouge Uréase ; pas de changement de couleur (-)/décarboxylase ; pas de changement de couleur(+)

I-5-3-1-Recherche de Catalase/oxydase

D'après nos résultats, nous avons constaté que toutes les souches isolées sont dépourvues de catalase et oxydase.



Figure 11 : Recherche de Catalase

I-5-3-2-Type respiratoire VF

Les résultats de type respiratoire de différentes souches sont réunis dans le **tableau N 07**



Figure 12 : développement des isolats sur VF

D'après nos résultats, nous avons remarqué que les souches $S \{6, 16, 9, 19\}$ se développent en absence de huile de paraffine donc ce sont des souches aérobie strict, alors que les (16) souches restantes ont proliféré dans les deux milieux donc ce sont des aéroanaérobies.

I-5-3-3-Mannitol mobilité

La fermentation du mannitol a été observée chez les 20 souches.

Pour la mobilité, nous avons constaté que les souches (1,2,3,4,6,7,8,9,10,11,13,15,20) sont mobiles, alors que les souches (5,12,14,16,17,18,19) sont immobiles.



Figure 13 : développement des isolats sur mannitol
mobilité

I-5-3-4-Utilisation des sucres TSI

Le milieu Triple Sugar Iron (TSI) indique la capacité des bactéries à dégrader le glucose, le lactose et/ou le saccharose.

D'après nos résultats, l'oxydation des trois sucres est observée chez toutes les souches. Par ailleurs, cette fermentation est accompagnée d'une production de CO₂ et sans production d'H₂S.

I-5-3-5-Utilisation de Citrate

A partir de la recherche de citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie pour les bactéries, dans ce test on observe que la majorité des souches étudiées (12) ont une capacité de fermenter les citrates de sodium qui entraîne une acidification de milieu, alors que les (08) souches restantes n'utilisent pas le citrate de sodium.



Figure 14 : développement des isolats sur Citrate de Simonne

I-5-3-6-Recherche de L'ONPG-hydrolase

Concernant les résultats d'hydrolyse de l'ONPG, nous avons remarqué que les 20 souches étudiées ne possèdent pas une β -galactosidase.



Figure 15: Recherche des β galactosidases

I-5-3-7-Production de l'urée indole

D'après nos résultats, nous avons constaté que les 20 souches se sont révélées une uréase négative.

Les résultats de la mise en évidence de l'indole, et donc de la tryptophanase, sont positive pour les vingt souches.

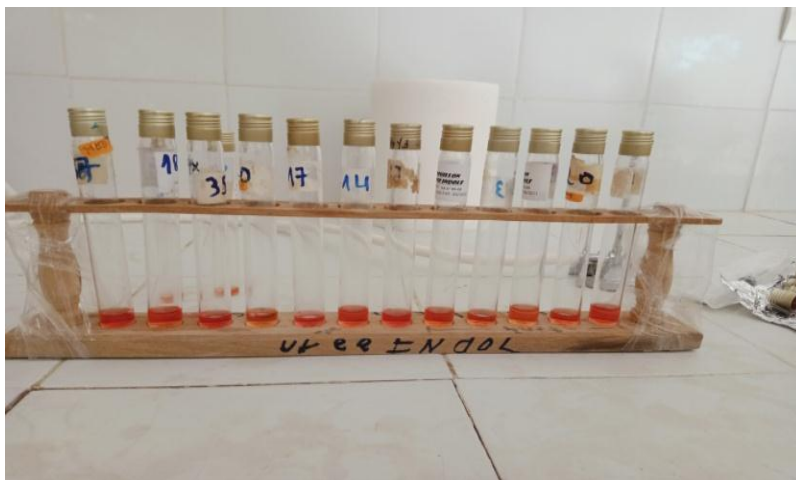


Figure 16 : développement des isolats sur Urée indole

I-5-3-8- Recherche de décarboxylase tests (ODC, LDC, ADH).

Les résultats de la recherche de la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et de l'arginine décarboxylase sont donnés dans le **Tableau (09)**. Sur l'ensemble des souches, ont une ADH, une ODC et une LDC positive.



Figure17 : La recherche de décarboxylase des isolats sur LDC, ODC, ADH

I-5-3-9- Caractérisation de type fermentaire (Clark et Lubs)

Nous avons constaté que les souches S{2,4,6,7,8 ,10,11,15,16,17 ,18} ont réagi positivement au test au rouge de méthyle, indicateur de la production d'acides mixtes et (09) souches sont réagi négativement à ce test ; pas de production des acides mixte.

Nous avons constaté que les (20) souches présentent un VP négatif.

I-6- Recherche de l'activité hydrolytique

La recherche des activités amylolytiques, protéolytiques, lipolytiques a été effectuée en milieu M1. Pour évaluer ces activités, nous avons utilisé les substrats suivants : caséine, amidon, tween 20, tween 80 et l'huile d'olive, respectivement **Figure (18 ,19 ,20 ,21 ,22)**.

Nos résultats sont présentés dans le **tableau** suivant :

Tableau 10 : recherche de l'activité hydrolytique

Isolat	L'amidon	Caséine	Twéen20	Twéen80	L'huile d'olive
S1	+	+	+	+	+
S2	+	-	+	+	+
S3	+	+	+	+	-
S4	+	+	-	+	-
S5	+	+	-	+	+
S6	+	+	-	+	+
S7	+	+	-	+	+
S8	+	-	+	+	+
S9	+	+	+	+	+
S10	+	+	+	+	+
S11	+	+	+	+	+
S12	+	+	-	-	+
S13	+	+	-	+	+
S14	+	+	+	+	+
S15	+	+	-	-	+
S16	+	+	+	-	+
S17	+	+	+	-	-
S18	+	-	+	-	+
S19	+	+	-	+	+
S20	+	-	+	-	-
<p>La croissance des bactéries (+) Pas de croissance (-)</p>					

I-6-1-Détermination de l'activité protéolytique

I-6-1-1-Hydrolyse de caséine

La majorité des souches présentent la caséinase qui est révélée par l'apparition d'une zone de clarification les résultats observe dans la figure nous avons observé que (16) souches produit la caséinase et les (4) souches ne produisant pas la caséinase.



Figure 18 : Hydrolyse de caséine des isolats sur milieu qui contienne caséine

I-6-2-Détermination de l'activité amylolytique

I-6-2-1Hydrolyse de l'amidon

Toute les souches étudiée possède une amylase qui est révéler sur gélose à l'amidon **figure (20)**. Les souches qui possèdent l'amylase donnent une zone jaune au tour de strie d'ensemencement autour des colonies.



Figure19 : Hydrolyse de l'amidon des isolats sur milieu qui contienne amidon

I-6-3-Détermination de l'activité lypolytique

La production de la lipase est stimulée par l'incorporation des l'huiles : l'huile d'olive, Tween 20, Tween80, dans les 20 souches.

I-6-3-1 Hydrolyse de Tween 20 et Tween 80

Les (12) souches étudiées ont la capacité d'hydrolyser le tween 20 qui se traduit par un halo d'opacification autour de la culture. C'est la capacité d'utiliser les lipides comme substrat et les (08) dernier souches peuvent pas hydrolyser tween 20, S{4,5,6,7,12,13,15,19}

Les (14) souches étudiées ont la capacité d'hydrolyser le tween 80 qui se traduit par un halo d'opacification autour de la culture. C'est la capacité d'utiliser les lipides comme substrat et les (06) dernier souches peuvent pas hydrolyser tween 80 ,S{12,15,16,17,18,20} .

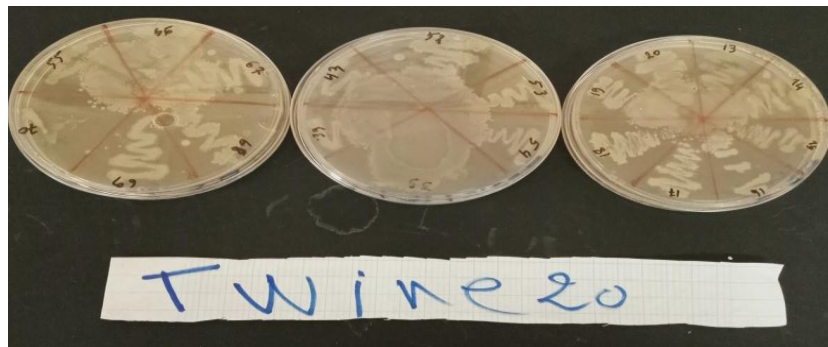


Figure 20 : Détermination de l'activité lypolytique des isolats sur milieu qui contient Tween 20



Figure 21 : Détermination de l'activité lypolytique des isolats sur milieu qui contient Tween 80

I-6-3-2-L'influence de l'huile d'olive

Sur un milieu ajusté avec huile d'olive et qui est ensemencé par des cultures de 18 heures nous avons observé qu'il y a (16) souches qui ont une capacité d'utiliser les lipides comme substrat et d'hydrolyser l'huile d'olive pour la production de lipase et les (04) souches ne peuvent pas hydrolyser la lipase.



Figure22 : Détermination de l'activité lipolytique des isolats sur milieu qui contient L'huile d'olive.

CONCLUSION

Conclusion générale

Les microorganismes thermophiles sont parmi les extremophiles les mieux étudiés, ces microorganismes sont capables de se développer dans des conditions extrêmes, à des températures élevées, dans des milieux à forte ou faible salinité, acidité ou alcalinité. Les microorganismes thermophiles se développent d'une manière optimale à des températures supérieures à 50°C et ont trouvés de nombreuses applications en raison de la particularité de leurs propriétés.

Des bactéries ont été isolées à partir de source thermale de hammam Sidi Aissa, Saïda, Algérie. Le milieu de culture utilisé pour l'isolement et l'identification est un milieu empirique (M1). Parmi les 86 souches isolées, 20 souches sont identifiées à 45 °C.

Les résultats ont montré que toutes les souches possédaient un ou plusieurs activités hydrolytiques, dominées par les activités protéolytiques et amylolytiques. Les 20 souches bactériennes ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique suivie d'une analyse biochimique et physiologique. En effet, l'identification des souches bactériennes sélectionnées ont montré que ce sont des aéroanaérobies, la majorité de ces souches sont mobiles, sous forme couque à Gram positif ou négatif, coccobacille à Gram positive et négative et bacille à Gram positive ou négative, ou sous forme isolés ou en chaine, possédant une oxydase et catalase négative, dégradant le mannitol.

Ces souches ont la capacité de produire des différents enzymes d'importance industriellement (amylase, protéase, lipase) à partir de plusieurs Substrats (Amidon, Caséine, Tween 80, Tween20, l'huile d'olive)

Pour nos perspectives de recherches au futur :

-L'étude phylogénétique des souches.

-La purification et l'analyse des enzymes produits par les isolats pour l'utilisation en biotechnologie.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

A

Aanniz T, Ouadghiri M, Melloul M, Swing, Elfahim E, Ibijbijben J, Ismaili M, Ammar M, (2015), Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes, and desert soils. Brazilian journal of microbiology, Vol. 46, no. 2, p.443453.

Adolphe Chapiro et liliana Perec J. Chim, 1996, la réglementation sur l'étiquetage et la présentation des huiles d'olives phuls vol 63 :842-844. D508 ; N° 05. V21, [http : //doi.org / 101051/ 04 /201405](http://doi.org/101051/04/201405), (02 septembre 2014).

Alain Karine, Claire Geslin, Anne Godfroy, Daniel Prieur, (2014), les thermophiles.

Ali Toudert, (2006), Les thermes et le thermalisme en Algérie.

B

Boucee Khelifa, (2016). Caractérisation de souche bactérienne isolée à partir de sources thermale du Nord algérien : étude des propriétés enzymatiques. Bacteriology, 2^{ème}éd. Vol 3, The Firmicutes. Springer, New York, USA,

C

Capecem. C. E, Clark J. K, Saleh D, Halford N, Heidl S, Hoskins et L. J. Rothschild (2013), Polyextremophiles and the constraints for terrestrial habitability. In Polyextremophiles.: p. 3-59. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6488-0_1],

Chibani Mosaab, Kaddouri Achwak, le 08 juin 2013, Actualisation d'étude Hydrogéologique et hydrochimique des eaux thermales–SAIDA- FERRERA I., Reysenbach A.L. (2007), Thermophiles in : encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons; P: 1-9.

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

D

De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B, (2009), Bergey'S Manual of Systematic Ferreral, Reysenbach A.L, (2007) , Thermophiles in: encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons; P: 1-9.

G

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

Gargouriy, Julien R, Pieroni G, Verger R. & Sarda L, (1986), Studies on the inhibition of pancreatic and microbial lipases by soybean proteins. Journal of lipid. research. 25: 1214-1221.

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

H

HarleyJ.P., Prescott L.M, (2002). Laboratory Exercises in Microbiology, 5th Ed., 449P

I

Itoh, T. et T. Lino, (2013). Phylogeny and biological features of thermopiles. In Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology.: Springer, p. 249-270. [https://doi.org/10.1007/978-94-0075899-5_9].

J

Joffin J.N., Leyral G. (2006). Microbiologie technique, tome 1 : dictionnaire des techniques 4ème édition. 361P.

K

Karl Setter, Karine Alain, Claire Geslin, Anne Godfroy, Daniel Prieur (2010). thermophiles.

krahet,M, Antranikian G. Mårki ,H. (1996) .fermentation of extremophilic microorganisms .FE MS microbiology Reviews ;18 (2-3),271-285.

Karine Alain, Claire Geslin, Anne Godfroy, Daniel Prieur (2014) Les thermophiles. (Madigan et Martinko, 2007 ; Alain et al., 2010). Diagnostic de la qualité des eaux de source et thermales De la Wilaya de Saida-Algérie- Effets thérapeutiques.) 2016.

M

Madigan, M. T., J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley et D. A. (2014) Stahl Brock biology of microorganisms, 14th edition. Edtioned. ISBN 9780321897398 0321897390.

Michael Madigan et John Martinko, (2007), Biologie des micro-organismes Michael Madigan et John Martinko.

Martins R.F., Davids W., Al-Sond W.A., Levander F., Radström P. and HattiKaul R., (2001). Starch-hydrolyzing bacteria from Ethiopian soda lakes. Extremophiles; vol. 5, p. 135-144 (117).

Morozkina E.V., Slutskaya E.S., Fedorova T.V., Tugay T.I., Golubeva L.I. and Koroleva O.V., (2010). Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application. Applied Biochemistry and Microbiology; vol.46, p. 114.

Mlle Larbi Daouadji Kelthoum (2016). Isolement et caractérisation des souches product.

Mlle. Lakhdari Fatna& Mlle. Bouaicha Kawther, (2016). Diagnostic de la qualité des eaux de source et thermales De la Wilaya de Saida-Algérie- Effets thérapeutiques.)

N

Nakagawa S., Shtaih Z., Banta A. (2005). Sulfurihydrogenibiumyellowstonense sp. nov., an extremely thermophilic, facultatively heterotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from Yellowstone National Park and amended descriptions of the genus Sulfurihydrogenibium, S. subterraneum, and S. azorense. Int. J. of Syst. And Evo. Microbio., 55 : 2263–2268.

N.marchal ,j .l.bourdon ,cl.richard, ,(1987) Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries,3^{eme} édition .

O

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

P

Panda M.K., Sahu M.K., Tayung, K. (2013). Isolation and characterization of a thermophilic Bacillus sp. with protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. Iranian journal of microbiology, 5(2), 159–165.

Q

Quérellou, J. et J. Guézennec (2010), Biotechnologie des extrémophiles. Techniques de l'Ingénieur, 1-13

R

Rekadwad, B. et J. M. Gonzalez (2018) Multidisciplinary involvement and potential of thermopiles. Folia Microbiological,

S

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

Sigurgisladottir S., Konraosdottir M., Jonsson A., Kristjansson J.K., Matthiasson E. (1993) Lipase activity of thermophilic bacteria from icelandic hot springs. Volume 15, Number 4, 361-366.

Surucu, G1999. “crozthréquirements of thermophilic aerobic microorgannes in mexed cultures for the tremtent of strong Wastes.” water science technologie 41:53-60.

Thomas Brock (1969). In, Aissat Ibtissam & Mekki Nadjat (2018). Isolement et caractérisation de bactéries de la source naturelle de Hammam Guergour (Nord de Sétif-Algérie).

Les cite

GOOGEL. <http://mapcarta.com> .07/Juin/2021

GOOGLE Maps 08/Juin/2021

<http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/repiquage/68391>

ANNEXES

Annexe n° 1

A. Colorants et réactifs

Réactifs de la coloration de Gram

- solution de violet de gentiane.
- Solution de lugol de Gram.
- Solution de fuschine de ziehl.
- Alcool éthylique.

- **Les huiles utilisées :**

Huile d'olive : est uniquement obtenue à partir de fruit de l'olive. (Adolphe CHAPIRO et liliana 2014).

Huile paraffine : pure contenant de la quantité variable d'acide oléique

L'addition de l'huile paraffine produit une très importance accélération de la réaction.

- **Réactif au rouge de méthyle :**

Orange de méthylène 0,02 g.
L'eau distillée.....100ml.

- **Réactif de Kovacs.**

- **Réactif Vogues Proskauer vp1.**

- **Réactif Vogues Proskauer vp2.**

B.Milieu culture

- ❖ **Milieu solide M1**

-L'extrait de levure4g.
-NaCl2g.
-Peptone8g.
-Agar agar20g.
- l'eau de source.....1000ml.

❖ **Milieu liquide**

-L'extrait de levure	4g.
-NaCl	20 g.
- Peptonine	8g.
- l'eau de source.....	1000 ml.

❖ **Milieu Clarke et lubs : RMVP**

Pour préparer 500 ml prendre

Glucose.....	2.5g.
.Peptones.....	2.5g.
Phosphate.	2.5 g.

❖ **Milieu solide avec NaCl 0%**

Pour préparer 100ml prendre :

Extrait de levure	0.4g.
Peptonine	0.8g.
Agar Agar.....	2g.

❖ **Milieu solide avec NaCl 5%**

-Pour préparer 100ml prendre

Extrait de levure	0.04g.
Peptonine.....	0.8g.
Agar Agar	2g.
NaCl.....	0.05g.

❖ Milieu solide avec NaCl 9%

- Pour prépare 100ml prendre

Extraits de levure.....	0.04g.
Peptonine.....	0.8g.
Agar Agar	2g.
NaCl.....	0.09g.
L'eau distillée.	100ml.

❖ Milieu solide avec NaCl 12 %

-Pour prépare 100ml prendre

Extraits de levure.....	0.04g.
Peptonine	0.8g.
Agar Agar.....	2g.
NaCl	0.12g.
L'eau distillé.....	100ml.

❖ Milieu nutritive à déférent pH

Milieu gélose à pH = 4.

Milieu gélose à pH = 9.

❖ **Milieu Gélose à Amidon**

Gélose nutritive.....100ml.

Amidon.....01g.

❖ **Milieu pour la mise en évidence de l'hydrolyse de tween**

Gélose nutritive100ml.

Tween 80.....10ml.

❖ **Milieu pour la mise en évidence de l'hydrolyse de tween 20**

Gélose nutritive.....100ml.

Tween 20..... 10 ml.

❖ **Milieu pour la mise en évidence d'hydrolyse l'huile d'olive**

Gélose nutritive100ml.

L'huile d 'olive 10 ml.

❖ **Milieu Mannitol-Mobilité**

Peptone20g.

Nitrate de potassium 1 g.

Mannitol 2 g.

Rouge de phénol 40 mg.

Agar 4 g.

Eau distille 1000 ml.

❖ **Gélose viande-foie :**

Extrait de viande10g.

Peptone20g.

Extrait de levure10g.

Glucose05g.

Agar15 g.

Eau distillée1000 ml.

❖ **Gélose de caséine**

Gélose
nutritive.....100 ml.

Caséine.....1g.

❖ **Milieu citrate de Simone :**

Citrate de sodium1g.

Bleu de bromothymol0,8 g.

Chlorure de sodium 5g.

Sulfate de magnésium 0.2g.

Hydrogénophosphate de potassium.....1g.

Dihydrogénophosphated'ammonium.....1g.

Agar-agar15g.

❖ **Urée indole :**

Urée2g.

Hydrogénophosphate de potassium.....1g.

Chlorure de sodium.....5g.

Ethanol à 95 %10g.

Rouge de phéno.....25g.

Eau distillée1L.

❖ **Eau physiologique :**

NaCl.....9g.

L'eau distillée.1000 ml

Abstract

Water is an essential element for living organisms because of its chemical properties, it has been used in many fields in the biophysical and chemical fields by its presence in heat sources; it also has been used as a treatment for many skin diseases and joint pain.

Algeria is an important geographical region, it contains hot springs, which in turn represent a medium for living microorganisms at high temperature, the distribution of hot water in Algeria varied from region to region depending on of temperature difference, these thermophilic microorganisms have different industrial importance due to their varied uses in various fields.

In Algeria, few studies have been carried out on thermal springs. During this study, thermophilic bacteria were isolated from the hot water of hammam sidi Aissa in Saïda. Through these studies the 86 strains were selected and studied their physiological and biochemical properties.

The twenty 20 bacterial strains isolated at 45 ° C is carried out on the same isolation medium; this strain have been purified and characterized using phenotypic physiological and biochemical approaches.

Key words: *high temperature, hot springs, thermophilic bacteria, Water.*

Résumé :

L'eau est un élément essentiel pour les organismes vivants en raison de ses propriétés chimiques, car elle a été utilisée dans nombreux domaines dans domaine biophysique et chimique par sa présence dans des sources de chaleur ; Elle a été utilisée comme traitement pour de nombreuses maladies de la peau et des douleurs articulaires

L'Algérie est une région géographique important, elle contient des sources chaudes, qui à leur tour représentent un milieu favorable pour certains microorganismes thermophiles.

La répartition des eaux chaudes en Algérie varié d'une région à l'autre en fonction de la différence de température, ces micro-organisme thermophiles ont une importance industrielle différente en raison de leurs l'utilisation.

En Algérie, peu d'études ont été menées sur les sources thermales, au cours de cette étude les bactéries thermophiles ont été isolées de l'eau chaude de hammam sidi Aissa à Saïda. A travers cette étude, 86 souches ont été isolées et 20 souches ont été sélectionnées pour étudier leurs propriétés physiologiques et biochimiques.

Les vingt 20 souches bactériennes isolée à 45° C, c'est réaliser sur le même milieu d'isolement ; cette souche a été purifiée et caractériser en utilisant des approches phénotypiques physiologiques et biochimiques.

Mots clés : température élevée, source chaude, bactéries thermophiles, l'eau.

ملخص

يعتبر الماء عنصر اساسي للكائنات الحية نظرا لخصائصه الكيماية حيث تعددت استعمالته في سائر المجالات الحيوية الفيزيائية والكيماية من خلال تواجده بمصادر حرارية تم استخدامه كوسيلة علاج للعديد من الأمراض كالأمراض الجلدية وألم المفاصل.

تعتبر الجزائر منطقة جغرافية هامة تحتوي على العديد من الينابيع الحارة التي بدورها تمثل وسط عيش للكائنات الحية الدقيقة المحبة للحرارة، كما أن توزيعها يختلف من منطقة الى منطقة حسب اختلاف درجة الحرارة، تتميز هذه الكائنات الحية الدقيقة المحبة للحرارة المرتفعة بأهمية صناعية نظرا لاستعمالاتها المختلفة في شتى الميادين.

القليل من الدراسات اجريت حول الينابيع الحارة المتواجدة في الجزائر، فمن خلال هذه الدراسات تم عزل 86 سلالة من حمام سيدي عيسى بولاية سعيدة حيث تم اختيار 20 سلالة من أجل دراسة خصائصها الفزيولوجية والكيميو حيوية.

الكلمات المفتاحية المصادر الحرارية الكائنات الحية الدقيقة المحبة للحرارة المرتفعة الماء حرارة مرتفعة.