

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun-Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Toxicologie et sécurité alimentaire

Présenté par :

- Melle. Hebila Djazia.
- Melle .Bouziane Kheira.
- Melle. Guelta Soumia.

Thème

Optimisation de la production de biomolécules des souches microbiennes Thermotolérantes.

Soutenu le 08 / 10/2020

Devant les membres de jury :

Président : Abbes M.A

M.C.A

Encadrant : Abdi Fatima.Z

Examinatrice : Lahoul H

Docteur

Année universitaire 2019/2020

Remerciement

Avant toute, nous remercions **ALLAH**, le tout puissant qui nous a donné la foi, la patience, et la santé durant toutes nos études et de nous avoir permis de accomplir ce travail.

Tout d'abord, nous tenons à remercier chaleureusement notre promotrice **Mme Abdi Fatima Z** qui a accepté la responsabilité de superviser ce travail, pour son aide, ses conseils, sa disponibilité, ces précieux encouragements, sa patience et sa confiance, a tout le long de notre travail.

Nos remerciements aux membres de jury :

❖ A notre président **Mr Abbes M.A** de nous avoir fait l'honneur et un immense plaisir de présider le jury de notre soutenance.

❖ A notre examinatrice **Mme Larradj Z.M** pour avoir accepté d'évaluer notre mémoire.

On tien aussi remercier les techniciens et les techniciennes des laboratoires que nous avons sollicités et qui ont répondu présents.

Egalement, nous avons tenons à remercier à tous les enseignants, les bibliothécaires de la faculté des sciences de la nature et de la vie.

L'ensemble des membres du département de biologie ;

Toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à réaliser ce travail.

Dédicace

De tout mon cœur je dédie ce modeste travail à :

Mes chères parents, qui m'ont beaucoup soutenu et encouragé jusqu'au bout. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A mon frère Khaled

A mes belles sœurs Rokia et Zinebe

A tous mes amis sans exception

A toute la famille Hebila et Youcef sans exception, à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Djazia

Dédicace

Je dédie ce travail ceux qui j'aime :

À mes parents, en témoignage de mon profond amour et mon plus grand respect.

À mes chères sœurs.

À tous mes amis surtout Louiza et Nadjate.

À tous ma famille, et à toutes les personnes qui m'ont aidée et soutenue de près ou de loin.

Kheira

Dédicace

Je dédie ce travail à :

-Mes parents ;

-Mes frères ;

-Mes sœurs ;

-A mes amies : Fatima, Samia, Ahlem, Fatima Zohra, Ahmed, Abed.

-A Tous mes camarades de promotion surtout Rania, Alia. Tu as été pour moi durant ces années passées ensemble plus qu'un ami, un frère.

Soumia

Résumé

Actuellement les microorganismes thermophiles sont très recherchés et demandés surtout dans les applications biotechnologiques grâce à leur importance des enzymes thermostables, et aussi l'effet thérapeutiques de ces microorganismes.

Cette étude porte sur l'identification morphologique, biochimique et physiologique des bactéries existantes dans la source thermale de Hammam , et permis d'avoir accès une caractérisation d'activité hydrolytique et antimicrobienne.

Nos résultats ont démontré que :

La totalité des souches sont des thermophiles modérés de forme *bacille*.

L'optimisation des conditions de croissance et de production des isolats impliqués tel que la température, PH et la concentration de NaCl sont mise en évidence.

Les quatre souches étudiées sont caractérisées par la production d'enzymes extracellulaires amylase, caseinase, lipase et l'estérase. Ainsi qu'ont une activité antimicrobienne vis-à-vis les genres : *E-coli*, *S.aureus* et *C.albicans*.

Mots clés : souches thermophiles, source thermale, enzyme, biomolécule, Tiaret

abstract

Now thermophilic microorganisms are highly sought after and in demand especially in biotech applications because of importance of thermostable enzymes, and also the therapeutic effect of these microorganisms.

This study focuses on the morphological, biochemical and physiological identification of existing bacteria in the Hammam Serguine hot spring, and provides access to hydrolytic and antimicrobial activity.

Our results showed that : All strains are moderate bacillus-shaped thermophilic.

The optimization of the growing and production conditions of biomolecules has shown that the optimal growth temperature of these strains is 45°C with a pH interval ranging from 5 to 10 with a concentration of NaCl ranging from 0 to 12%

The four strains studied are characterized by the production of extracellular amylase, caseinase, lipase and lesterase. As well as antimicrobial activity against the genres : *E-coli*, *S. aureus* and *C.albicans*.

Keywords : thermophilic strain, hot spring, enzyme, biomolecule, Tiaret

ملخص

تعتبر الكائنات الحية الحرارية حاليا الأكثر دراسة وخاصة في تطبيقات التكنولوجيا الحيوية وذلك لما لها من أهمية خاصة الانزيمات التي تنتجها بالإضافة الى التأثير العلاجي لهذه الكائنات

تركز هذه الدراسة على التعرف المورفولوجي و البيوكيميائي و الفسيولوجي للبكتيريا الموجودة في الينابيع الحارة (حمام سرغين) و كذا دراسة القدرة الامامية لهذه الكائنات بالإضافة الى نشاطها المضاد للميكروبات اظهرت نتائج دراستنا ان جميع السلالات هي حرارية معتدلة تظهر على شكل عصيات اما بخصوص العوامل المساعدة على النمو و انتاج المركبات الحيوية فتعتبر درجة الحرارة 45م بمثابة درجة مثلى للنمو كما يعتبر الاس

الهيدروجيني الامثل لنمو هذه الكائنات يتراوح من 5 الى 10 كما لاحظنا ان هذه الكائنات تستطيع النمو في درجة ملوحة تتراوح من 0 الى 12% تتميز السلالات الاربعة التي تمت دراستها بانتاج الاميلاز البروتياز و الليباز و الاستيراز فضلا عن نشاطها ضد الميكروبات

كلمات مفتاحية بكتيريا محبة للحرارة ينابيع حارة انزيم مركبات حيوية تيارت

Liste des abréviations

ADH : Arginine Dihydrolose.

C° : Degré celsius.

g : gramme.

H.O : huile d'olive

h : heure

j : jeure

LDC : Lysine Décarboxylase

Max : maximale

Min : minimale

n° : Numéro.

Nacl : chlorure de sodium.

ODC : Orto-nitro-phényl- β -D-galactopyroside.

PH : potentiel d'hydrogène.

s : seconde.

TSI : Triple Sugar Iron.

Tween : polyxethylene sorbitane manooléate.

% : pourcentage.

P/V : poids en volume.

GN : gélose nutritive

BN : bouillon nutritive

n° de figure	Titre	Page
1	Classification des bactéries selon leur température optimal de croissance (Vieille et Zeikus, 2001 ; Demirjian et al., 2001).	03
2	Schéma de l'étape d'enrichissement.	06
3	Schéma de l'activation et purification bactériennes.	07
4	Aspect macroscopiques des souches.	19
5	Observation microscopique des colonies (coloration de Gram).	20
6	Résultats d'utilisation de milieu TSI.	22
7	Résultats des citrates de Simmons.	23
8	Résultats de croissance à différents pH.	27
9	Exemples d'activités hydrolytiques.	30
10	Activité antimicrobienne des isolats vis-à-vis des souches pathogènes, ou potentiellement pathogène.	31

LISTE DES FIGURES

n° de tableau	Titre	Page
1	Aspect macroscopique des isolats.	17
2	Aspect microscopique.	18
3	Caractérisation biochimiques des isolats.	24
4	Caractérisation physiologique de croissance.	26
5	Résultats d'activités hydrolytiques.	28

LISTE DES TABLEUX

Remerciement

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les thermophiles	02
2. Diversité taxonomique et métabolique des bactéries thermophiles.....	02
3. Classification des bactéries thermophiles.....	02
4. Habitat et écologies des thermophiles.....	03
5. Intérêts des thermophiles en biotechnologie.....	04
6. Optimisation.....	04

Chapitre 2 : Matériels méthodes..... 06

1 Lieu d'étude	06
1.1. Souches bactériennes.....	06
1.2 Enrichissement.....	06
1.3 Purification et activation.....	07
1.4 Identification des souches.....	08
a. Etude macroscopique.....	08
2. Etude microscopique.....	08
Coloration de Gram.....	08
1.5. Identification biochimiques.....	09
1.5.1 Test de catalase.....	09
1.5.2 Test d'oxydase.....	09
1.5.3 Teste d'ONPG.....	10
1.5.4 Test de TSI.....	10
1.5.5 Test de mannitol- mobilité.....	11
1.5.6 Type respiratoire(VF).....	11
1.5.7 Décarboxylases ODC, LDC et ADH.....	12
1.5.8 Utilisation de citrate Simmons.....	12
1.6 Identification physiologique.....	13
1.6.1 Influence de température, PH et Nacl.....	13
1.7. La mise en évidence d'activité hydrolytique.....	13

1.7.1 Hydrolyse de l'amidon.....	13
1.7.2 Hydrolyse de caséine.....	14
1.7.3 Hydrolyse de TW20 et TW80.....	14
1.7.4 Hydrolyse de l'huile d'olive.....	14
1.8 Activité antimicrobienne.....	15
Chapitre 3 : Résultats et discussion.....	17
3.1 Identification des isolats.....	17
3.1.1 Identification morphologiques.....	17
3.1.1.1 Caractérisation macroscopiques.....	18
3.1.1.2 Caractérisation microscopiques.....	19
3.2 Caractérisation biochimique des isolats.....	21
3.3 Caractérisation physiologique des isolats.....	25
3.4 La mise en évidence d'activité hydrolytique.....	28
3.5 Activité antimicrobienne.....	30
Conclusion.....	
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction...

INTRODUCTION

L'homme a utilisé les micro-organismes pendant plusieurs années dans la fabrication des différents produits. Ces micro-organismes, se retrouvent essentiellement dans notre environnement (dans l'air, le sol, les eaux) (**Smaoui, 2010**).

La découverte des micro-organismes dans les environnements particuliers a dès lors déclenché une sorte de chasse aux extrêmophiles. Depuis quelque année, cette chasse a abouti à la découverte d'une diversité inouïe, complètement attendues, des micro-organismes qui ne sont pas seulement contestés par un extrême (**Mesbah et Wiegel, 2008**). Les micro-organismes extrêmophiles ont développés des stratégies très variées pour s'adapter aux contraintes physico-chimiques telles que la température, la pression, salinité et pH..... (**Gregoire et al., 2009**).

En Algérie, il y a beaucoup de sources d'eaux thermale et minérale depuis longtemps. Ces eaux ont été convoitées depuis des lustres par les différents expéditions coloniale, les romains, les laborantins français qui se sont intéressés de près à cette denrée et à son usage thérapeutique (**LakhdarI et Bouaicha, 2016**).

Les bactéries thermophiles sont t'appelé aussi les thermorésistantes, se sont des microorganismes qui habitent dans les sources chaude, vivent à des températures très élevés (**Panda et al., 2013**). La température est un facture nécessaire pour la croissance de ces bactéries (**Julien, 2014**).

Ainsi ; Les bactéries thermophiles ont besoins de plusieurs éléments nutritif tell que les vitamines ; les acides aminées et aussi le calcium ; le magnésium pour la stimulation de la croissance (**Surucu, 1999**).

Ces bactéries thermophiles sont utilisées dans des déférents domaines : la production des carburants, la bioconversion de déchets, la technologie des enzymes, la production des protéines unicellulaires..... (**Zeikus, 1979**).

L'objectif de ce travail de recherche est de faire une identification et caractérisation des souches bactériennes isolées à partir d'une source thermale « Hammam Serguine, Wilaye de Tiaret », suivie par une optimisation des conditions de production et de croissance des ces souches bactériennes et une évaluation de pouvoir hydrolytique et antimicrobien des isolats.

*...Synthèse
bibliographique...*

1 Généralités sur les thermophiles

Les organismes thermophiles sont des organismes ayant besoin d'une température élevée pour se développer. La définition la plus reconnue de cet organisme a été proposée par **Thomas Brock (1926)**. Selon cette définition, 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 **Kari Stetter (1986)** et qualifie d'organismes thermophiles, tous les êtres vivants se développant à des températures supérieures à 45°C. Selon cette dernière définition, elle définit 3 sous-catégories au sein des thermophiles :

Les thermophiles modérés: dont les conditions optimales de croissance se situent entre 55 et 65 °C.

Les thermophiles extrêmes : dont la température optimale de croissance est comprise entre 65 et 80 °C.

Les hyperthermophiles : dont la température optimale de croissance est supérieure à 80°C (**Alain et al., 2010**).

2- Diversité taxonomique et métabolique des bactéries thermorésistantes

La taxonomie des micro-organismes thermorésistants du domaine bactéries est largement basée sur les caractéristiques physiologiques et métaboliques très diverses incluant des phototrophes, des chimiolithotrophes, des autotrophes et des hétérotrophes (**Aissat et Mekki, 2018**).

3- Classification des bactéries thermophiles

La température est une variable importante de chaque écosystème. Pour cette raison, la classification des organismes vivants sur la base de leur température optimale de croissance est considérée comme un aspect fondamental utilisé pour classer les bactéries (**Boulefkhad et Talhi, 2018**). Les bactéries sont classées en 04 catégories : les psychrophiles (-5°C à 20°C), les mésophiles (15°C à 45°C), les thermophiles (45°C à 80°C), et les hyperthermophiles (>80°C) (**Vieille et Zeikus, 2001**).

Certain classe de thermophiles forment deux suas classe, thermophiles modérés (45C° à 65C°) et les thermophiles à proprement dit (65C° à 85C°) (**Dermijian et al., 2001**).

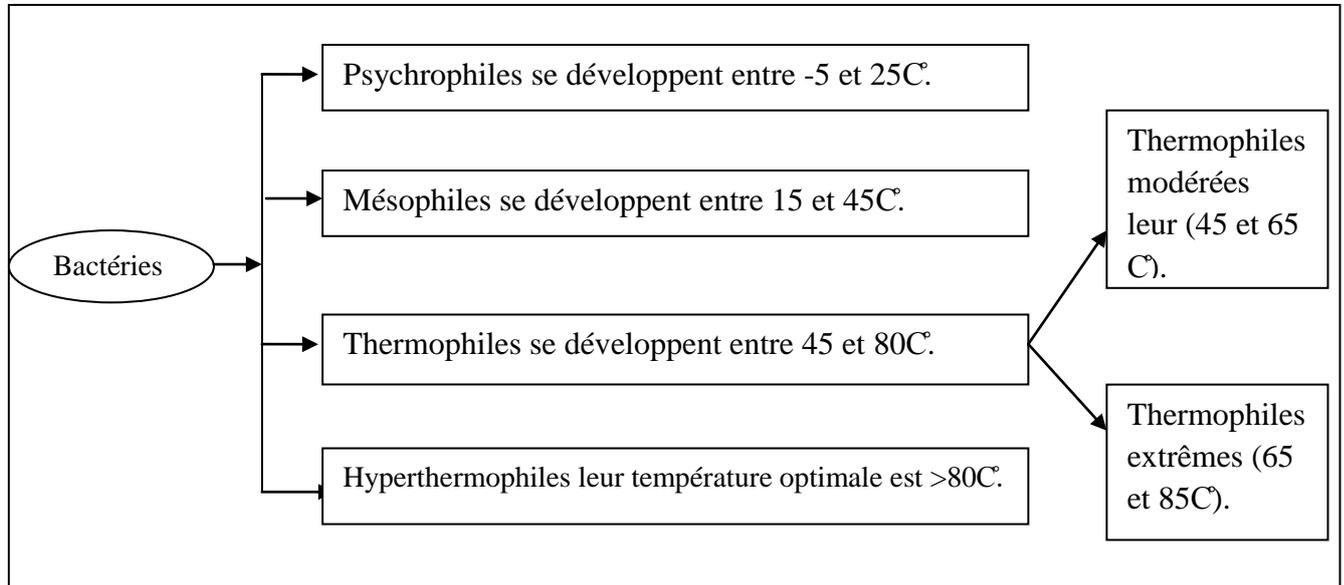


Figure n°01 : Classification des bactéries selon leur température optimal de croissance (Vieille et Zeikus, 2001 ;Demirjian *et al.*,2001).

4- Habitat et écologies des thermophiles

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

D'après **Gacem et Rouibi(2002)** ; Ces biotopes se répartissent sur plusieurs endroits de la planète. Ils sont caractérisés par une température très élevée moyennement comprise entre 55 et 60 c°. D'autres biotopes thermobiotiques présentent une température dépassant les 100c°. C'est le cas des sources géothermales localisées généralement dans les zones volcaniques et les fonds océaniques. La répartition de ces sources est associée à l'activité tectonique du globale. Les organismes colonisant ces écosystèmes sont surtout des thermophiles ayant un optimum de croissance de 55 à 60c° et des hyper thermophiles dont l'optimum de croissance dépasse 85c° (**Gacem et Rouibi, 2002**).

Parmi les bactéries thermophiles le plus connue, on retrouve essentiellement : les *bacillus* (*bacillus stearothermophilus*, *geobacillus*, *stearothermophilus*, *bacillus coagulans*). *Thermus*, *Thermomicrobium*, *symbiobacterium*, *clostridium* (*clostridium thermocellum*) (Larbi, 2015).

5-Intérêts des thermophiles en biotechnologie

Les microorganismes thermophiles ont eu de grand intérêt scientifique plus principale en ce qui concerne leur potentiel biotechnologiques (Ben Salem *et al.*, 2012). Parmi les grand nombre d'enzymes de bactéries thermophiles les cellulases, les amylases, les xylanases, les pullulanases, mannanase, pectinases, protéases, lipases, les estérases et les phytases (Sunna et Bergquist, 2003).

Ces microorganismes jouent un rôle fondamentale dans l'équilibre biologique de la nature, ainsi que leur capacité de dégrader les composés chimiques entre autre les herbicides, les pesticides...etc.

Les organismes extrêmophiles suscitent un intérêt biotechnologique particulier en raison de leur potentiel important dans la production de biomolécules hautement stables aux conditions physico-chimiques extrêmes.

La biotechnologie des extrêmophiles est venue combler le vide existant entre les processus biologiques et chimiques. En effet seuls les enzymes produites par ces micro-organismes sont potentiellement actives dans les conditions extrêmes de température et PH (Olle et Scharp, 1997 ; Gacem et Rouibi, 2002).

6- optimisation des capacités biotechnologiques des thermophiles

L'optimisation permet de mettre en évidence l'effet des paramètres culturels tels que les sources de carbone et d'azote, les sels minéraux et les conditions de culture (pH, température, aération et agitation) sur la biosynthèse des métabolites secondaires.

La production des métabolites diffère en fonction des souches, par conséquent les paramètres culturels affecteraient la production et le rendement en molécules bioactives (Wang *et al.*, 2008).

*...Matériel et
Méthode...*

Objectifs du travail

Notre propos est d'essayer de faire un screening des biomolécules sécrétées par des souches thermophiles isolées partir des eaux de la source thermale de hammam Serguine wilaya de Tiaret.

Lieu d'étude

Cette étude a été réalisée au niveau de Laboratoire de reproduction des animaux de la ferme et au Laboratoire d'hygiène et pathologie animale à l'université d'Ibn khaldoun-Tiaret.

1. Matériel

Tout le matérielles utilisées sont résumés dans l'Annexe (01).

1.1 Souche bactérienne étudiée

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont isolées l'année passée à partir des eaux de sources thermales et sont notées comme suit : **s1**, s2, s3, s4.

1.2 Enrichissement

A l'aide d'une pipete boutonné, prélever une colonie des souches pures conservé à 4° et la déposer dans le tube a essai qui contient le bouillon nutritif BN (annexe 02), ensuit incubé à 37° pendant 24h.

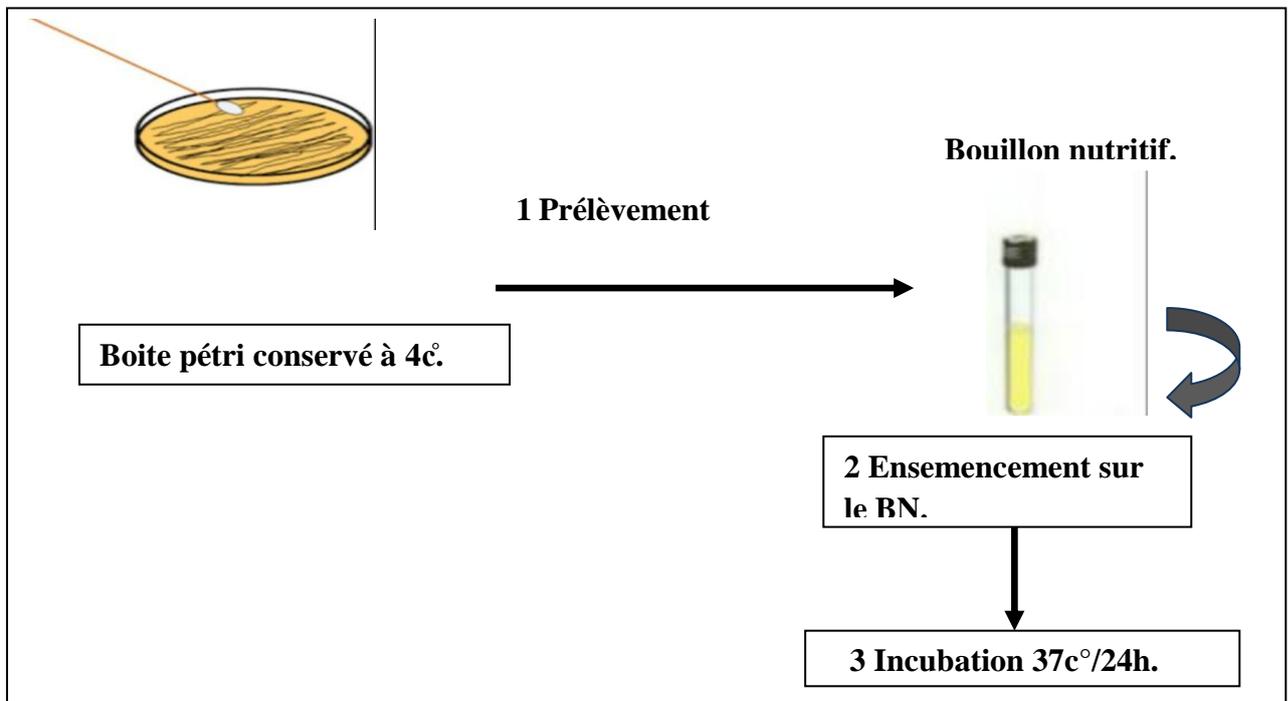


Figure n°02 : Schéma de l'étape d'enrichissement.

1.3 Purification et activation

Par une once de platine, prélever une colonie bactérienne d'une culture jeune enrichie mettre dans le milieu gélose nutritif GN (Annexe 02).

Après, utiliser une pipete Pasteur boutonnée pour faire des stries sur la gélose GN.

Mettre ensuite les boites Pétri dans l'incubateur à 37 pendant 24h à 48h.

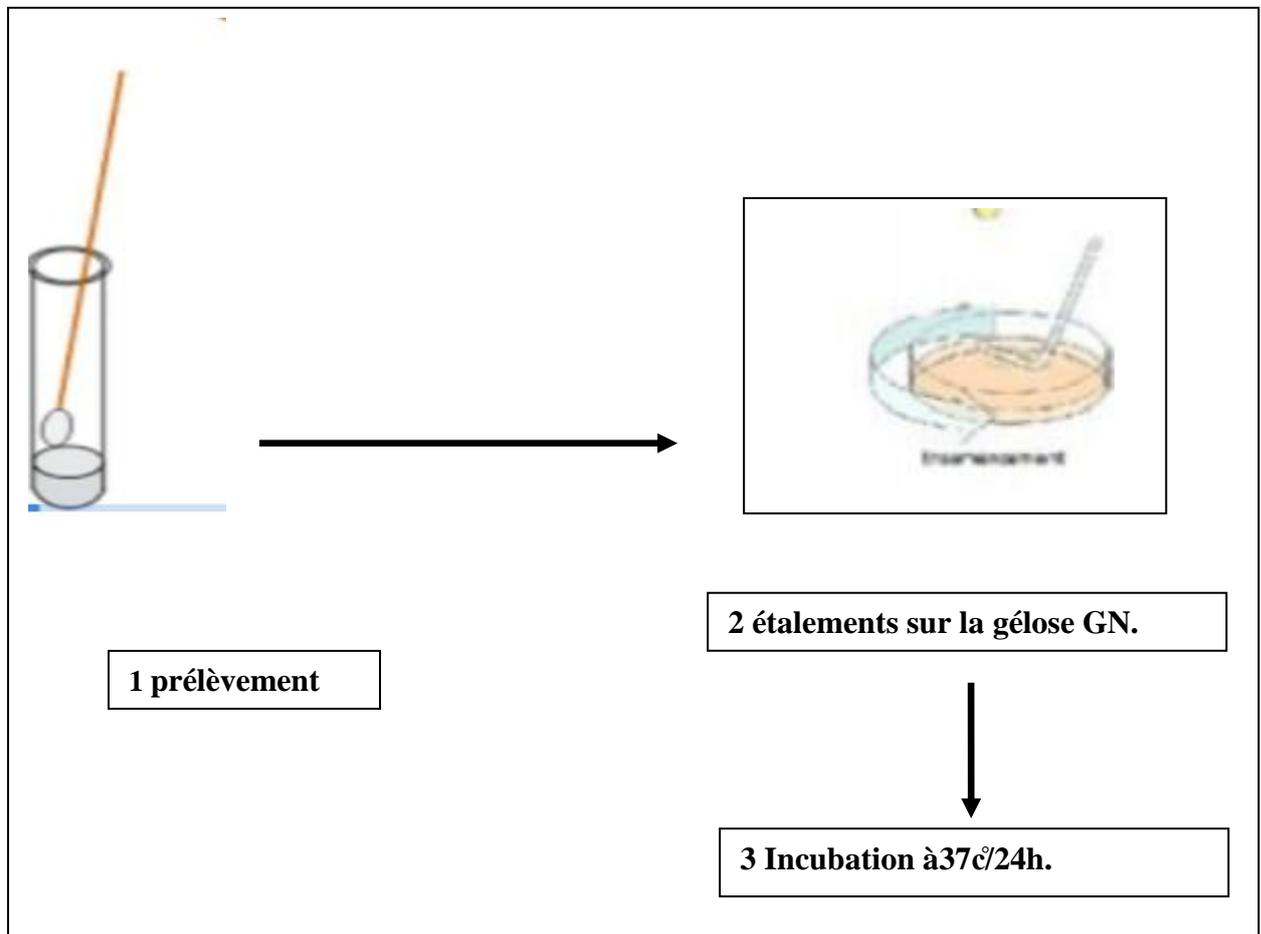


Figure n°03 : Schéma de l'activation et purification bactériennes.

1.4 Identification des souches

Elle est basée sur l'étude des caractères morphologiques et biochimiques.

a. Identification morphologique

1 Etude macroscopique

Cette étude permet de déterminer l'aspect macroscopique des colonies : la forme, la couleur, la taille...(**Benkahoul et al., 2017**) .

2. Etude microscopique

➤ Coloration de Gram

La coloration de Gram permet de classer les bactéries en deux grandes catégories : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (**Bourdon et Marchal, 1973**).

Elle a été réalisée selon les étapes suivantes :

- a. Déposer une goutte d'eau désilée sur une lame bien propre.
- b. Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un Bec Bensen.
- c. Coloration par le violet de Gentiane pendant 1 min puis rinçage à l'eau désilée.
- d. Mordançage avec le Lugol (1 min) suivi d'un rinçage à l'eau désilée.
- e. Décoloration à l'alcool (1 min) après rinçage avec l'eau distillée.
- f. Recoloration avec la solution de Fuchine (30 s).
- g. Laver à l'eau distillée.
- h. Après séchage soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (×100).

1.5 Identification biochimiques

1.5.1 Test de catalase

Principe

La catalase est une enzyme produite par les bactéries ayant un métabolisme respiratoire qui permet la dégradation de l'eau oxygénée (H_2O_2) en eau métabolique (H_2O) et oxygène (O_2) (Dechache et Mofradj, 2013). Cette réaction chimique de dégradation s'établit comme suit :



Technique

Sur une lame en verre bien nettoyée, mettre une goutte de l'eau oxygénée, puis déposer une colonie bactérienne. La présence d'une catalase se traduit en quelques secondes par la formation de bulles d'oxygène (Tankeshwar, 2013)

1.5.2 Test d'oxydase

Principe

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme respiratoire qui catalyse la fixation de l'hydrogène et des électrons sur l'oxygène. Cette réaction mise en évidence par des disques (ox) imprégnés d'oxalate N-N-1 diméthyl paraphénylène (Larbi, 2015).

Technique

A l'aide d'une pipette pasteur, déposer une colonie bactérienne sur un disque imprégné du réactif de l'oxydase de Kovacs, placé sur une lame. La présence de l'enzyme se traduit par un virage de la couleur vers le bleu violée.

1.5.3 Test d'ONPG

Principe

Le test ONPG ou le test ONPG- Hydrolase est un test complémentaire permet de détecter l'hydrolyse de l'ONPG par une β -galactosidase et libère le galactose et l'orthonitrophénol(ONP). La présence d'une β -galactosidase se traduit par la libération de l'orthonitrophénol de couleur jaune après la durée d'incubation (**Amara et Khaldi, 2015**).

Technique

En réalisant une suspension bactérienne des souches testées dans l'eau distillée, à l'aide d'une pince flambée et refroidie nous avons ajouté le disque imprégné d'ONPG.

A la fin incuber à 45C° pendant 30 min.

1.5.4 Teste de TSI

Principe

Le TSI (Triple Sugar Iron) est un milieu de culture gélosé incliné à trois sucres (le glucose présent dans le culot ; le lactose et le saccharose sont présent dans le penté). Ce milieu est principalement utilisé pour déterminer la fermentation du glucose (avec ou non de gaz) ; en outre du lactose et/ou saccharose, et aussi la production d'hydrogène sulfuré H₂S (**Batahri, 2014**).

- Le virage du culot au jaune traduit la fermentation du glucose.
- La présence de bulles de gaz signifie la fermentation avec production du gaz.
- Le virage de la pente au jaune traduit l'utilisation du lactose ou saccharose ou les deux à la fois.
- Une coloration noire, signifie la production d'hydrogène sulfure H₂S (**Bellamani, 2015**).

Technique

Une colonie des souches bactériennes est ensemencée en formant une piqure centrale dans le culot et fait des stries serrées sur la pente, l'incubation à été effectué à 37°C pendant 24h.

1.5.5 Test de mannitol-mobilité

Principe

Ce test permet d'étudier la fermentation du mannitol ainsi que la mobilité des souches.

La fermentation du mannitol est traduite par un virage de couleur au jaune du milieu du culture et pour la mobilité des souches est interprétée à partir de strie d'inoculation et de trouble dans le milieu pour les bactéries mobiles et les bactéries immobiles persistent près de la piqure centrale (**Boullouf, 2014**).

Technique

A l'aide d'une pipete pasteur boutonnée, une colonie de la souche est ensemence par piquer centrale dans la tube de mannitol-mobilité et puis incubée à 37°C pendant 24h.

1.5.6 Type respiratoire (VF)

Principe

La recherche de type respiratoire est caractérisé sur le milieu solide viande foie (voire Annexe). Après une incubation de 24h, on observe les types de la culture au niveau des tubes :

- Culture à la surface : Type aérobie stricte.
- Culture partout sauf à la surface : Type anaérobie stricte.
- Culture dans tout le tube : Type aéro-anaérobie facultatif.
- Culture près de la surface du tube : Type microaérophile (**Aissat et Mekk, 2018**).

Technique

La gélose viande foie coulée dans les tubes à essai stériles, ensemencer les souches en doublée deux (02) tubes dont l'un des deux ; ajouter l'huile de paraffine sur la gélose (pour le maintien de l'anaérobiose). Incuber les tubes à 45C° pendant 24h.

1.5.7 Décarboxylases ODC ; LDC ; et ADH

Principe

Ces tests sont réalisés sur les bouillons « LDC-ODC-ADH » qui sont appelé les milieux se Moëller. Ainsi que ces tests permettre de déterminer la présence des décarboxylases et dihydrolase bactériennes (**Meziani, 2012**).

Technique

A partir d'une colonie bactérienne jeune, ensemencer les milieux LDC, ODC, et ADH qui ont été recouverts par une couche fine de l'huile de paraffine pour assurer l'anaérobiose.

1.5.8 Utilisation du citrate Simmons

Ce test permet de déterminer la capacité des bactéries à utiliser le citrate comme seule source de carbone pour ses besoins énergétiques.

La pente du milieu est ensemencée avec la suspension de la bactérie à tester par des stries sur toute la surface.

Incuber à 45C°, pendant 24 heures.

Lecture

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

Pour la bactérie citrate négative, le milieu garde sa couleur d'origine (vert) (**Harley et Prescott, 2002**).

1.6 Identification Physiologique

1.6.1 Influence de température, PH et Nacl

L'influence de la température, le PH et de la concentration en Nacl est sur la croissance des bactéries est effectuée sur le milieu solide en variant un des paramètres alors que les deux autres sont reste constants.

La croissance est contrôlée périodiquement entre 24 et 72h d'incubation.

Les milieux solidesensemencés sont incubés à 4C° ; 28C° ; 45C° et 65C°.

La tolérance au Nacl est étudiées en faisant varier la concentration finale de ce paramètre à 0 ; 8% ; 9% et 12% (p/v) (**Nazina et al., 2001**).

Pour le pH, l'intervalle de la croissance choisie est de 5 à 10 (**Harley et Prescott, 2002**).

1.7 La mise en évidence d'activités Hydrolytique

Les isolats sont soumis à une recherche d'activité hydrolytique extracellulaires (protéolytique, amyliolytique et lipolytique) à 4C° ; 28C° ; 45C° et 65C°. Cette recherche est réalisée sur le milieu de base (annexe 02).

1.7.1 Hydrolyse de l'amidon

Les souches bactériennes sont cultivées sur un milieu de base contenant 1% d'amidon soluble (annexe 02). Les boites sont incubées à 4C° ; 28C° ; 45C° et 65C° pendant 48h..Après incubation, le milieu gélosé est recouvert d'une solution de Lugol. La présence d'une activité amyliolytique se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des colonies.Par contre, un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture (**De Vos et al., 2009**).

1.7.2 Hydrolyse de caséine

Le test à été réalisé sur le milieu de base contenant 5% (p/v) de lait écrimé (voire Annexe 02). Le milieu est coulée dans les boites de Pétri puisensemencé par des stries des souches tester à la surface et incubé à 4C° ; 28C° ; 45C° et 65C° dans un période de 1à 3j.

La présence de cette activité est détectée par la formation d'un halo clair autour des colonies (**Roxana et al., 2009**).

1.7.3 Hydrolyse de TW20/80

Le milieu de base stérile est additionné de 1% (p/v) de TW20/80 puis les souches sontensemencées en strie sur la surface de milieu après incubation pendant 1à 3j à 4C° ; 28C° ; 45C° et 65C°.

Après incubation, le développement d'un précipité (zone opaque) autour des colonies témoigne la présence d'une lipase (**Gonzale et al., 1978**).

1.7.4 Hydrolyse de l'huile d'olive

Cette activité est recherchée par l'ensemencement des souches sur le milieu de base additionné l'huile d'olive stérile (annexe 02). Puis incuber les boites à 4C° ; 28C° ; 45C° et 65C° pendant 1à3j.

Une lecture positive est traduite par l'apparition des zones translucides autour des spots (production de l'estérase).

1.8 Activité antimicrobienne

Le pouvoir antimicrobienne est déterminé par la méthode de stries croisées. Cette activité permet de cribler les souches productrices de molécules antimicrobiennes actives. Elle consiste à :

- Sur une boîte de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton (annexe 02), ensemencer la souche par une strie centrale, puis incubé à 37°C pendant 48h après standardisation.
- Revivifiées les souches testées (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC25922 et *Candida albicans*) dans le bouillon nutritif et incubé à 37°C pendant 30 min.
- Enrichies pendant 24h à 37°C.
- Ensemencées par des stries croisées perpendiculairement (90°C) à celle de notre souche. Incubé à 37°C pendant 48h.
- Par ailleurs, dans une autre boîte témoin du milieu Mueller Hinton est ensemencée avec les souches testées (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC25922 et *Candida albicans*) et incubé dans les mêmes conditions.

La production de molécules antimicrobiennes est exprimée en termes de zone d'inhibition partielle ou totale des souches tests (**Zidan et Maddi, 2017**).

*...Résultat et
Discussion...*

3. Résultats

Les résultats de ré-identification des bactéries étudiées sont récapitulés dans les tableaux suivants :

3.1 Identification des isolats

L'identification des souches isolées est basée sur l'étude des caractères morphologique, biochimiques et physiologiques.

3.1.1 Identification morphologique

3.1.1.1 Caractérisation macroscopique

Un total de quatre(04) souches ont été choisies et ré-identifiées sur le milieu GN. Les résultats obtenus sur le milieu GN après 24hd'incubation à 45C° sont regroupée dans le tableau 01 ci-dessous.

Tableau n°1 : Aspect macroscopique des isolats.

Souche	Forme	Couleur	Conteur	Aspect
S1	Poudreuse	Blanche	Irrégulier	Muqueux
S2	Poudreuse	Blanche	Irrégulier	Muqueux
S3	Poudreuse	Blanche	Irrégulier	Rugueux
S 4	Poudreuse	Blanche	irrégulier	Muqueux

3.1.1.2 Caractérisation microscopique

Après la coloration de Gram, l'observation microscopique a révélé les résultats représentés dans le tableau (02). Parmi les quatre isolats, trois(03) sont des bacilles Gram(+) alors que la quatrième est à Gram(-) (figure n°02).

Tableau n°2 : Aspect microscopique.

Souches	Gram	Forme	Couleur
S1	-	Bacille	Rose
S2	+	Bacille	Violé
S3	-	Bacille	Rose
S4	-	Bacille	Rose



Figure n° 4: Aspect macroscopique des souches.

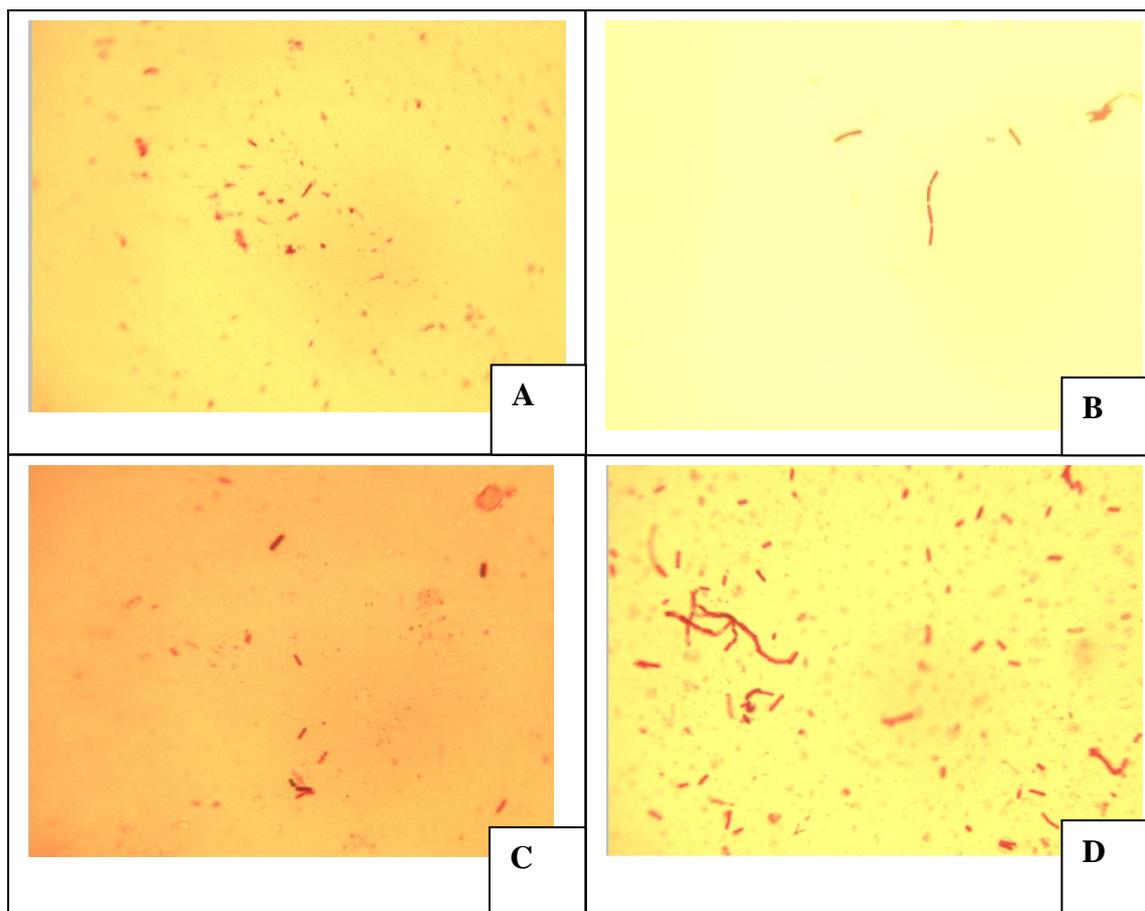


Figure n° 5 : Observation microscopique des colonies (coloration de Gram).

A : souche S1.

B : souche S2.

C : souche S3.

D : souche S4.

3.2. Caractérisation biochimique des isolats

3.2.1 Test de catalase

Toutes les souches bactériennes que nous avons testées ont une catalase positives (+).

3.2.2 Test d'oxydase

D'après le tableau (03), Les résultats de ce test ont montré que toutes les souches isolées ont une oxydase négative(-).

3.2.3 Recherche de la β -galactosidase

Sur les quatre(04) souches testées, deux (02) souches (**S2** et **S3**) possèdent une β – galactosidase et les deux autre souches **S1** et **S4** ont donné un résultat négative(-).

3.2.4 Type respiratoire

Les résultats obtenus sur le milieu viande foie VF montrent que les quatre(04) isolats (**S1**, **S2**, **S3**, **S4**) peuvent croître tout au long du milieu, donc nous pouvons dire que nos bactéries sont aérobie-anaérobies facultatives.

3.2.5 Utilisation des sucres sur milieu TSI

Le tableau (03) mentionné que les isolats (S et S) sont capables de fermenter le galactose, lactose et saccharose alors que les souches S et S ne fermentent que le glucose. Cette fermentation n'est pas accompagnée d'une production de **CO₂** et d'**H₂S**



Figure n°6 : Résultats d'utilisation de milieu TSI.

3.2.6 Test de Mannitol-Mobilité

Ce milieu de culture permet l'étude de la fermentation de mannitol ainsi que la mobilité des isolats. Nous avons observé que tous les isolats sont capables de fermenter le mannitol. Concernant la mobilité, les souches **S1 et S3** sont mobiles alors que les souches **S2 et S4** sont immobiles.

3.2.7 Utilisation de citrate Simmons

D'après les résultats présentés dans la figure n° 08, nous avons remarqué que tous les souches étudiées sans exception utilisent le citrate de Simmons comme une seule source de carbone et entraînent une alcalinisation du milieu traduite par un virage du couleur de vert vers le bleu.

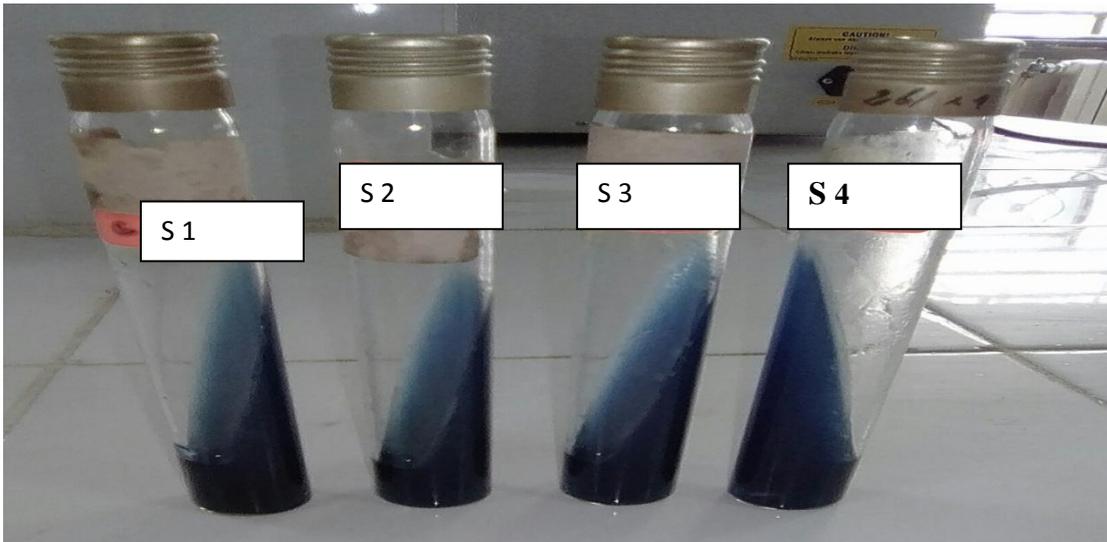


Figure n °7: Résultats des citrates de Simmons.

3.2.8 Décarboxylase d'ADH, LDC et ODC

Les résultats de la recherche de la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et de l'arginine dihydrolase sont présentés dans le tableau (03).

Nous avons constaté que les quatre(04) souches possèdent une ADH(+), LDC(+) et ODC (+) sauf S2 ODC (-).

Tableau n° 3 : Caractérisation biochimique des isolats.

	S1	S2	S3	S4
Cat	+	+	+	+
Oxy	-	-	-	-
β- gal	-	+	+	-
Mob	m	im	m	Im
VF	AAF	AAF	AAF	AAF
Glu*	+	+	+	+
Lac *	-	+	-	-
Sac *	-	+	-	+
ADH	+	+	+	+
LDC	+	+	+	+
ODC	+	-	+	+
Man	+	+	+	+
Cit	+	+	+	+

+ : réaction positive. - : réaction négative. β-gal : β-galactosidase. Mob : mobilité. VF : viande de foie. Glu*, Sac*, Lac* : les sucres de milieu TSI. m : mobile, im : immobile, AAF: aéro-anaéro-facultative.

3.3. Caractérisation physiologique des isolats

Les résultats des caractérisations physiologiques sont présentés dans le tableau n°(4).

3.3.1 Croissance à différents PH

Le Ph est un facteur important qui influe sur la physiologie d'un micro-organismes (**Vijayabharathi et al., 2012**).

D'après nos résultats, nous avons constaté que la croissance des quatre souches est optimale dans l'intervalle de pH situé entre 5 et 10, donc nous pouvons dire que nos souches sont acido-alcalophile.

Selon **Morozkina (et al, 2010)**, les thermophiles peuvent se développer dans les milieux aussi dans les milieux basiques donc elles sont considérées comme des acido-alcalophiles.

3.3.2 Croissance à différents température

La température est l'un des paramètres de l'environnement les plus importants vis-à-vis de l'impact sur la croissance et la survie des microorganismes (**Aissat et Mekki, 2018**).

Sur la base des résultats obtenus dans le tableau (05), nous avons remarqué que :

Toutes les souches sont incapables de se développer à 4°C. Par ailleurs nous avons également remarqué que les souches sont capables de proliférer dans une température qui varie entre 28°C et 65°C avec une croissance optimale dans la température 45°C et 65°C. D'après **Stetter (1996)**, les thermophiles sont classés en thermophiles modérées dont la température de croissance optimale comprise entre 50°C et 70°C, et des thermophiles extrêmes dont leur température optimale de croissance entre 70°C et 80°C et en hyperthermophiles dont leur température optimale de croissance est inférieure à 80°C. Grâce à cette classification, nous pouvons conclure que nos souches sont des thermophiles modérés, car leur température optimale de croissance située entre 45 à 65°C.

3.3.3 Tolérance de NaCl

Selon les résultats mentionnés dans le tableau suivant, nous avons remarqué que tous les isolats sont capables de développer en absence de chlorure de sodium. Ainsi que ces isolats sont capables aussi de développer en présence de NaCl, avec des concentrations différentes (située entre 0 et 12%).

D'après ces résultats, nous pouvons dire que nos souches peuvent se développer en absence de NaCl ou en présence ce qui indique que ces souches sont des halotolérantes extrêmes.

Selon **DanSorm(2006)**, les bactéries thermophiles sont classés halotolérants extrême lors que leur capacité de tolérants la concentration du NaCl entre 0% et 20%, et en halotolérants modérés dont la concentration est comprise entre 2% et 15%, en ce basent sur cette classification, les souches qu'on a testées et qui tolèrent une concentration de NaCl entre 0% et 20% sont qualifiées de thermophiles halotolérants extrême.

Tableau n° 4: Caractérisation physiologique de croissance.

Les souches	PH [Min-Max]		Température [Min -Max]				NaCl [Min -Max]			
	5	10	4	28	45	65	0	8	9	12
S1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
S2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
S3	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
S4	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

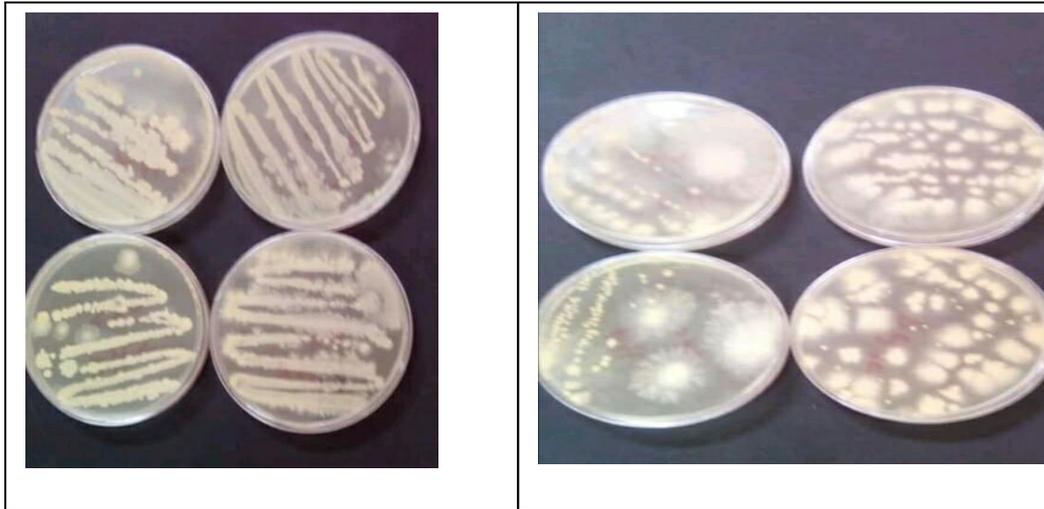


Figure n°8 : Résultats de croissance à différents PH.

3.4 La mise en évidence de l'activité hydrolytique

La détermination des activités amylolytiques, protéolytiques et lipolytiques a été effectuée en présence des substrats suivants : amidon, caséine, Tween 20, Tween 80 et huile d'olive respectivement. Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.

Tableau n° 5: Résultats d'activités hydrolytiques.

	S1				S2				S3				S4			
	4C°	28C°	45C°	65C°												
Amidon	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
caséine	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Tw20	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
TW80	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
H.O	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Incubation à 4C°,28C°,45C°,65C° pendant 1 à 3j																

3.4.1 Activité amylolytique

D'après les résultats présentés dans le tableau (6), nous avons remarqué que les quatre (4) isolats possèdent une activité amylolytique à une température de 28C°, 45C° et 65C°. Par contre, à 4C° n'observe aucune activité amylolytique (absence d'un halo clair).

3.4.2 Activité protéolique

Le tableau (6) montre que tous les souches bactériennes testées sont capables d'hydrolyser la caséine dans les différents températures d'incubation (28C°, 45C° et 65C°).

Contrairement, nous avons remarqué qu'à 4C° n'y a pas une dégradation des caséines.

3.4.3 Activité lipolytique

Selon le tableau (6), nous avons remarqué que tous les souches sont incapables d'hydrolyser le TW20, TW80 et l'huile d'olive.

Par ailleurs l'ensemble de ces souches à des températures 28C° ,45C° et 65C° hydrolysent le TW20, TW80 et l'huile d'olive par la production des enzymes spécifiques.

D'après nos résultats, nos souches possèdent une activité enzymatique intéressante à des températures élevées, alors que cette activité est diminuée à des basse températures.

Selon Alain *et al.* (2010), les enzymes issus des bactéries thermophiles sont thermostables, pour cela ils sont convoités pour divers procédés qui se déroulent à haut température.

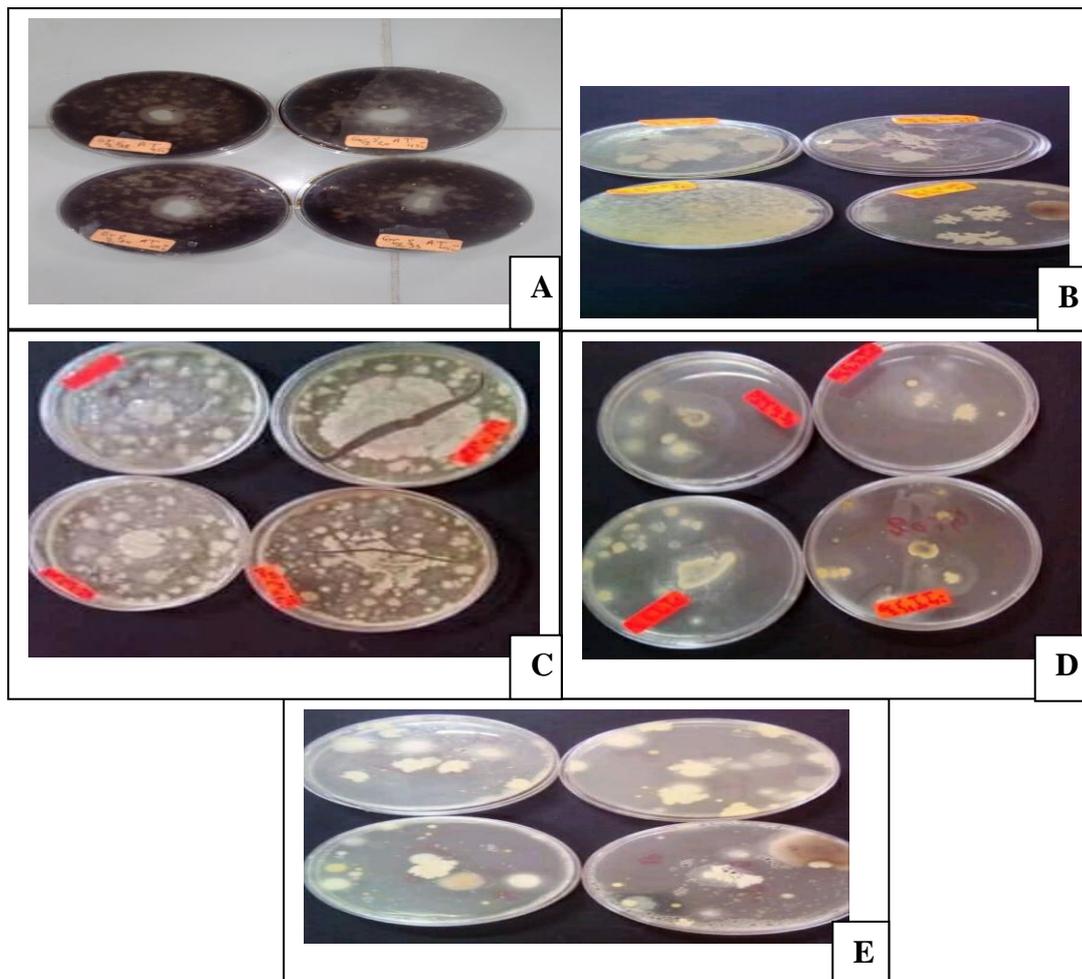


Figure n° 9 : Exemples d'activités hydrolytiques.

A : hydrolyse de l'amidon à 45C°.

B : hydrolyse de caséine à 45C°.

C : hydrolyse de TW80 à 65C°.

D : Hydrolyse de TW20 à 65C°.

E : Hydrolyse de l'huile d'olive à 65C°.

3.5 Pouvoir antimicrobienne

Les antibiotiques sont produits par des microorganismes fongiques et bactériennes, et inhibent ou tuent à des concentrations spécifiques des autres microorganismes (**Akoua et al., 2004 ; Benbachir et al., 2001**).

La recherche de l'activité antimicrobienne permet de cribler les souches productrices des molécules antibactériennes actives et se traduira par une inhibition partielle ou complète des souches pathogènes.

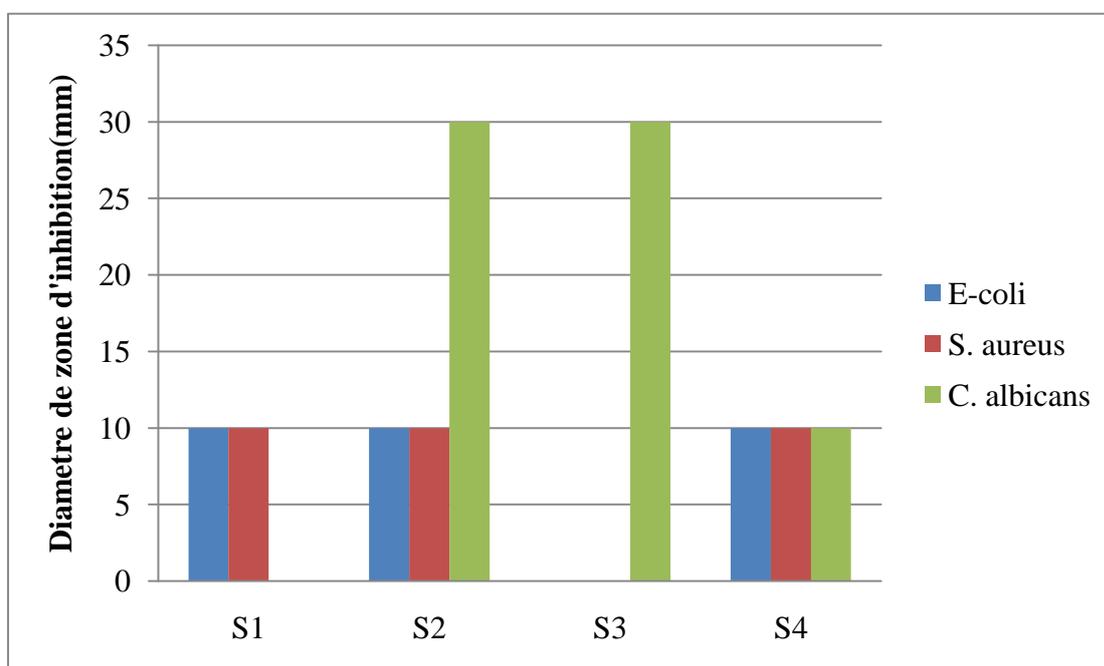


Figure n°10 : Activité antimicrobienne des isolats vis-vis des souches pathogènes, ou potentiellement pathogène.

Les résultats obtenus de l'activité antimicrobienne après l'incubation à 37C° pendant 48h donnant des zones d'inhibition de différents diamètres (tableau (8) et figure 13). Cette activité de nos souches a été mise en évidence par la technique des stries croisée.

Les résultats portés sur le tableau et la figure ci-dessus montrent que le pouvoir d'inhibition est observé chez les quatre(4) isolats. En effet les zones d'inhibition varient entre 5mm et 30mm

Parmi les nombreux antibiotiques connu sont produits par les thermophiles (**Loucif, 2011 ; Sujatha et al, 2005**).

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

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

CONCLUSION

Conclusion

Les microorganismes thermophiles possèdent un intérêt biotechnologique très intéressant en raison de leur capacité de produire des biomolécules hautement stables aux conditions physico-chimiques extrêmes..

Cette étude consiste à faire une optimisation de croissance des bactéries thermophiles dans des différentes températures, pH et concentrations de NaCl. Puis une mise en évidence de la production des biomolécules à travers l'évaluation de pouvoir enzymatique et antibactérien de ces souches

Les souches choisies ont été sujets d'une caractérisation morphologique, biochimique et physiologique. Ainsi d'un dépistage d'activité enzymatique et antimicrobienne.

D'après l'identification morphologique et biochimique des quatre souches sélectionnées, nous avons trouvé qu'elles sont des Bacilles à Gram négatif(-) sauf S2 qu'est Gram positif(+). Ce sont des aéro-anaérobies facultatives, immobiles. La totalité des souches utilisent le lactose, saccharose, citrate de Simmons et le mannitol comme source de carbone et/ou d'énergie.

Toutes les souches sélectionnées ont la capacité de dégrader le glucose, lactose et/ou saccharose mais cette fermentation n'est pas accompagnée par une production de CO₂ et d'H₂S.

L'étude de l'optimisation de la croissance des souches a été révélée que la croissance a son optimum à un pH situé dans l'intervalle [5-10] avec une température de 45 C° à 65 C° et une concentration de NaCl située entre 0% et 12%.

Ces souches ont la capacité de produire des enzymes extracellulaires telle que l'amylase, protéase et lipase.

L'activité antimicrobienne est réalisée par la méthode des stries croisées. Les souches thermophiles ont un pouvoir antimicrobien très intéressant vis-à-vis les germes pathogènes (*S. aureus* et *C. albicans*) ou potentiellement pathogènes (exp. *E. coli*).

Références bibliographiques

1. **Ahsene S. (2014).** Optimisation de la production d'un métabolite bactérienne d'intérêt Technologique.
2. **Aissat I., Mekki N. (2018).** Isolement Et Caractérisation De Bactéries De La Source Naturelle De Hammam Geurgour(Nord De Sétif-Algérie).
3. **Akoua koffi C., Guessend N., Gbonon V., Faye-Kette A. Y. H., Dosson M. (2004).** Methicillinresistant of staphylococcus aureus in Abidjan. A new hospital problem. *Medicines et maladies infectieuses.* 34(3), p : 132-136.
4. **ALAIN K., GESLIN C., GODFROY A., PRIEUR D. (2010).** Les Thermophiles[en ligne].https://www.infremer.fr/content/download/12612/file_fiche_big2010_thermophiles. Consulté le /05/2020.
5. **Amara I., Khaldi Z. (2015).** Isolement, identification et étude de l'antibiorésistance des Souches bactériennes isolées a partir de services de réanimation et d'hémodialyse de CHU Ourgla.
6. **Awais M., Aamer A.S., Abdul H., Fariha H. (2007).** Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by bacillus sp. *Pak J. Bot.,* 39(4) :1303-1312.
7. **Batahri N.I. (2014).** Propriété d'adhésion et pouvoir enzymatique des *Bacilles* thermophiles isolés du lait liquide et en poudre.
8. **Belmenai M., Benhafed N.E. (2015).** Isolement et caractérisation des hydrocarbonoclastes.
9. **Belmenai M., Benhafed N.E. (2015).** Isolement et caractérisation des hydrocarbonoclastes.
10. **Ben Salem R., Omrane B., Marie Laure F. (2012).** Caractérisation d'une souche bactérienne thermophile d'*ureibacillus Thermosphaericus* isolée à partir de la station Thermale de Karbous coproductrice des proteases et amylase. *Association Tunisienne des Sciences Biologiques.* V, 23. N°, 15. P : 150.
11. **Benbachir M., Benredjeb S., Boye C.S., Dosso M., Belabbes H., Kamoun A., Kane O., Elmdaghri N. (2001).** Two-year surveillance of antibiotic resistance in streptococcus pneumonia in four cities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 45(2), p : 627-629.
12. **Benkahoul M., Talhi A., Boulefkhad N. (2017).** Bactéries des environnements Chauds Algériens : Isolement et mise en évidence de la production d'hydrolases. *J, Science et Technologie.* N°, 45.P :25-35.

13. **Boulefkhad N., Talhi A. (2018).** La Mise En Evidence De La Production De Quatre Enzymes (Protéase, Amylase, Cellulase Et Pectinase) Par Des Micro-organismes Isolés A Partir D'eau Thermale Et Sol Proche Des Sources Thermales.
14. **Boulouf A. (2016).** Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries Lactiques du fromage traditionnel « Bouhezza».
15. **Bourdon J.L., Marchal.N. (1973).** Techniques Bactériologiques. 6th Ed. P : 20.
16. **Calteau A. (2005).** Relations évolutives entre les bactéries et les archées hyperthermophiles. Thèse de Doctorats en microbiologie. Université de Bretagne occidentale. France. P : 21-23.
17. **DasSarma.S.(2006).** Extrême halophile are models four aftrobiology.Microbe-American Society for Microbiology.1(3), 2006.
18. **Dechache A., Mofradj Z. (2014).** Contribution à l'étude de conservation d'une souche de Lactocoques isolée à partir du lait caprin..
19. **Dermirjian D.C., Moris-varas F., Cassidy C. (2001).** Enzymes from extremophiles. Current opinion in Chemical biology. V,5. n°,2. P : 144-151.
20. **Gacem K., Rouibi K. B. (2002).** Contribution A L'étude Des Bactéries Thermophiles De La Source Hydrothermale De Hammam Charef.
21. **Grégoire P., Fardeau M. L., Guasco Bouanane A Michotev., Pbonin K. (2005).**les micro-organismes de l'extrême. Press Therm Climat. V, 146. P : 49-61.
22. **Haberra S. (2013).** Production, Optimisation et étude De Xylanases Chez Une Nouvelle Souche D'actinomycète Thermophile Isolée Du Compost De Poulet.
23. **Herly J.P. Prescott L.M. (2002).** Laboratory Exercices in Microbiology. 5th Ed, P : 449.
24. **Julien L. (2014).** Découverte et caractérisation des premiers virus de Thermotogales (bactéries Thermophiles et anaérobies) issus de sources Hydrothermales Océanique.Thèse de Doctorat. Université de Bretagne occidentale.
25. **Lakhdari F., Bouaicha K. (2016).** Diagnostique de la qualité des eaux de sources tt thermales de la Wilaya De SAIDA –Algérie-Thérapeutique.
26. **Larbi D.k. (2014).** Isolement Et Caractérisation Des Souches Productrices De Lipase.
27. **Loucif k. (2011).** Rrcherche de substance antibactérienne à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives.
28. **Mesbah N. M., Weiegel J. (2008).** Life at extreme limits. The Anaerobic Halophilic Alkalithermophiles. Annals. N.Y. Aca.Sci.1125. P :44-57.

29. **Meziani M. (2012).** Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétique : Cas des *Entérobactéries* et *Pseudomonas*.
30. **Morozkina E.V., Slutskay E.S., Koroleva O.V. (2010).** Extremophilic microorganisms : Biochemical adaptation and biotechnological application. Applied Biochemistry and Microbiology. 46(1). P : 1-14.
31. **Nazina T.N., Tourova T.P., Poltraus A.B., Novikova E.V., Grigoryan A.A., Ivanova A.E., Lysenko A.M., Petrunyaka V.V., Osipov G.A., Ivanov M.V. (2001).** Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli : descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov. sp.nov.and *Geobacillus uzensis* sp. nov. From petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus tkaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. Int., J., Syst., Evol., Microbiol., 51 : 433-446.
32. **Olle H., Richard S. (1997).** Comparative Biochemistry and physiology Part A : Physiology. Thermophiles and fermentation technology. V, 118. P : 415-422.
33. **Panda M.K., Sahu M.K., Tayung K. (2013).** Isolation and caractérisation of a thermophilic *Bacillus* sp. With protease activity isolated from hot Spring of Tarabalo. 5(2). P : 159-165.
34. **Smaoui S. (2010).** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat.
35. **Stetter K.O. (1996).** Hyperthermophilic prokaryotes. F.E.M.S. Microbiol. Review, 18. P : 149-158.
36. **Sujutha P., Raju KB., Ramana T. (2005).** Studies on a new marine Streptomycete BT-408 producing polykatede antibiotic SBR-22 effective against methicillin restant *Staphylococcus aureus*. Microbiological research. 160(2). P : 119-126.
37. **Sunna A., Bergquist P.L. (2003).** A gene encoding a novel extremely thermostable 1,4- β - Xylanase isolated directly from an anvironmental DNA sample. V,1. P :63-70.
38. **Surcucu G. (1999).** Growth requiremets of thrmophilic aerobic microorganisms in mixed cultures for the treatment of strong wastes. Water Science and Technology. 40(1). P : 53-60.
39. **Syed C.M., Safia A., Abdul H. (2009).** Antibiotic production by thermophilic bacillus specie SAT-4. Pak. J Pharm. Sci., Vol. 22, No. 3, pp. 339345. Techniques 4^{ème} édition. 361P.

40. **Vielle C., Zeikus G. J. (2001).** Hyperthermophilic Enzymes : Sources, Uses And Molecular Mechanismes For Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* V, 65.N°,01.P :1-43.
41. **Vijaybarathi R., Devi P.B., Sathybarna S., Brubeirn P., Priyadrisini V.B. (2012).** Optimization of resistomycin production purified from *Streptomyces aurantiacus* AAA5 using response surface methodology. *J Biochem Tech.* 3(4) :402-408
42. **Yakhlef W., Darbouche A. (2012).** Metabolic Diversity of Thermophilic Bacteria from Hot Springs in Algeria. *Journal Academica* Vol.2(1), pp. 57-65.
43. **Zeikes J. G. (1979).** Enzyme and Microbiol Technology. *Thermophilic Bacteria : Ecology, Physiology And Technology.* V,51. N°, 4. P :243- 252.
44. **Zidane H., Maddi A. (2017).** Optimisation et modélisation de la production des molécules bioactives par une souche *d'actinobactérie Streptomyces* sp.D2.

Annexes

Listes de verrerie et d'appareillage

Listes de verrerie

- Bécher
- Boites pétri
- Erlenmeyer de 500 ml
- Flacon de 250 ml
- Lames et lamelles
- Pipettes pasteur
- Tubes à essais stériles

Listes d'appareillage

- Agitateur
- Autoclave
- Ballonc
- Bec bunsen
- Etuve
- Four pasteur
- Microscope optique
- Ph mètre électronique
- Réfrigérateur

Listes de produits et réactifs

Listes de produits

- ADH
- Agar-agar
- Amidon
- Caséine
- Eau distillée
- Eau oxygéné
- Eau source
- Extrait de levure
- Extrait de viande
- HCl
- Huile d'olive
- Huile de paraffine
- LDC
- NaCl
- NaOH
- ODC
- Peptone
- TW20 et TW80

Listes de réactifs

- Alcool
- Liquide de Lugol
- Solution de Fuchsine
- Violet de Gentiane

Compositions des milieux de cultures

Gélose nutritifs :

Agar-agar.....	15g
Extrait de levure.....	4g
Peptone.....	8g
Eau source stérile.....	1000ml

Ph =6.51

Bouillon nutritifs :

Nacl.....	2g
Peptone.....	8g
Extrait de levure.....	4g
Eau source stérile.....	1000ml

Ph =7.4

Milieu TSI

Peptone.....	20g
Agar-agar.....	12g
Lactose.....	10g
Saccharose.....	10g
Nacl.....	05g
Extrait de viande.....	03g
Extrait de levure.....	03g

Glucose.....	01g
Citrate de fer.....	03g
Rouge de phenol.....	0,025g
Na ₂ S ₂ O ₃	0,3g

Ph =7

Milieu citrate de Simmons

Agar-agar.....	15g
Nacl.....	05g
Sodium citrate.....	02g
Bleu de bromothynol.....	0,08g
MgSO ₂ 7H ₂ O.....	0,2g
K ₂ HPO ₄	01g

PH : 6,6

Milieu de mannitol mobilité

Peptone trypsique de viande.....	20g
Mannitol.....	2g
Rouge de phénol.....	40mg
Agar-agar.....	4g
Eau distillée.....	1000ml

Ph =7.6

Gélose viande -foie

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

PH=7.2

L'eau péptonée

Chlorure de sodium.....	05g
Peptone.....	10g
Eau distillée.....	1000ml

pH=7.2

Milieu Muller-Hinton

Amidon.....	1.5g
Agar-agar.....	17g
Eau distillée.....	1L
Hydrolysate de caséine.....	17.5g
Infusion de viande.....	300g

PH=7.4

Milieu de base

Peptone.....	1.6g
Agar-agar.....	3g
Extrait de levure.....	0.8g
Eau distillée.....	200ml

Gélose à l'amidon

Milieu de base.....	100
Amidon.....	10mg

Gélose à caséine

Milieu de base.....	100ml
Caséine.....	10mg

Gélose à TW20

Milieu de base.....	100ml
TW20.....	2ml

Gélose à TW80

Milieu de base.....	100ml
TW80.....	2ml

Gélose à l'huile d'olive

Milieu de base.....	100ml
Huile d'olive.....	2ml

N.B. Tous les milieux utilisés sont stérilisés pendant 30min à 121C°.

L'ajustement du PH des milieux de cultures s'effectue à l'aide d'une solution de NaoH ou d'une solution d'HCl.

Technique de standardisation

La standardisation des germes cibles utilisés suit la méthode des suspension dilutions corrélés à la mesure de la densité optique à différentes longueurs d'onde de chaque germe étudiés, après un balayage au spectrophotomètre des longueurs d'ondes ont été fixées pour chaque germe qui correspond à une DO de 0.5 de la solution mère, la charge de l'inoculum utilisé est de 107 UFC/ ml (**Zidane et Maddi, 2017**).