



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE IBN KHALDOUN-TIARET

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.  
Département des Sciences De la nature et de la Vie.

Domaine : Sciences de la Nature et de la vie.

Filière: Sciences Biologiques

Option : Microbiologie appliquée

**MEMOIRE PRESENTE POUR L'OBTENTION  
DU DIPLOME DE MASTER**

Par :

**SEMAHI ABED & LABED AHMED**

**Thème**

**Screening d'activité enzymatique des bactéries  
thermophiles isolées de la source thermale  
Serguine (Tiaret).**

**Soutenu le : 01 / 07 / 2020**

**Devant le jury composé de :**

<b>Président</b>	Mr. ACEM K.	MCA	Université de Tiaret
<b>Encadrant</b>	Mm. ABDI F.Z.		Université de Tiaret
<b>Examinatrice</b>	Mm. MEDJBER N.	MCB	Université de Tiaret

**Année universitaire : 2019 /2020**

# *Remerciements*

*Avant tout nous remercions **ALLAH**, le tout puissant qui nous a donné, la patience et la santé durant toutes les années de nos études et surtout en accomplissant ce modeste travail.*

*Tout d'abord, nous tenons à remercier **Mme. ABDI Fatima Zohra** pour nous avoir donné la chance de travailler sous sa direction, pour sa confiance en nous et ses encouragements mais surtout pour sa générosité dans le travail, qu'elle trouve en ces mots toute notre gratitude.*

*Nos remerciements vont également aux membres de jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail, au président **Mr. ACEM Kamel**, à l'examinatrice **Mm. MEDJBER Nassira**.*

*Nous tenons à remercier l'ensemble de la promotion Microbiologie appliquée 2019/2020.*

*Nos sincères remerciements à toutes les personnes qui travaillent au laboratoire de la de reproduction des animaux de la ferme et toutes personnes qui nous ont aidé, conseillé, orienté et encouragé tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

**ABED ET AHMED**

# *Dédicace*

*Avant tout, je remercie Dieu tout puissant de m'avoir accordé la force, le courage et les moyens afin de pouvoir accomplir ce modeste Travail.*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, le respect, la reconnaissance, c'est simplement que : Je dédie ce mémoire de Master*

*A la lumière de ma vie ma mère : **HACHEMI Kheira**, tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.*

*A mon très cher Père: **ABDALOUAHAB**, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être*

*A mes frères et A mes sœurs*

*Pour leurs encouragements et je leurs souhaite tout le bonheur et la réussite*

*A tous ceux qui ma sont chers et proches et tous ma famille*

*A mon binôme : **LABED Ahmed***

*A tous ceux qui me sens chers et que j'ai omis de citer*

*A toutes mes chers ami (es) intimes et mes collègues de l'université*

***D'IBN KHALDOUN TIARET.***

**SEMAHI ABED**

# *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire à :*

*A ma chère maman : **CHERIF Fatma** , qui m' à sacrifié tout sa vie et ses efforts.*

*A mes chères : **LAZREG***

*A mes chères sœurs : **Khaldia , Djamila et Halima***

*A mes enseignants qui ont contribué à ma formation pendant les cursus scolaire*

*A mes amis : **Nour Eddine , Houari , Mohamed , Ahmed et Madjid***

*A mon binôme : **SEMAHI Abed** et toute la promotion de microbiologie appliquées.*

***LABED AHMED***

## Liste des abréviations

<b>Mots</b>	<b>Signification</b>
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique.
<b>ADH</b>	Arginine Dihydrolase.
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique.
<b>Ami</b>	Amidon.
<b>BE</b>	Bouillon d'Enrichissement.
<b>B-gal</b>	B-galactosidase.
<b>Cit</b>	Citrate.
<b>Cat</b>	Catalase.
<b>Cas</b>	Caséine.
<b>Cell</b>	Cellulase.
<b>Glu</b>	Glucose.
<b>GN</b>	Gélose Nutritive.
<b>Gal</b>	Galactose.
<b>GéL</b>	Gélatine.
<b>H O</b>	Huile d'Olive.
<b>Lac</b>	Lactose.
<b>LDC</b>	Lysine Décarboxylase.
<b>Man</b>	Mannitol.
<b>Mob</b>	Mobilité.
<b>MB</b>	Milieu de Bases.
<b>ODC</b>	Ornithine Décarboxylase.
<b>Oxy</b>	Oxydase.
<b>ONPG</b>	Ortho-Nitro-Phényl- $\beta$ -Galactoside.
<b>P / v</b>	Poids par Volume.
<b>PCR</b>	Polymerase ChainReaction.
<b>Sach</b>	Saccharose.
<b>TSI</b>	Triple SugarIron.
<b>VF</b>	Viande-Foie.
<b>V/V</b>	Volume par Volume.

## Liste des figures

<b>Figure N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page N°</b>
<b>Figure 01</b>	Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative de séquences de gènes ribosomiques.	03
<b>Figure 02</b>	(a) source chaude localisée dans le Parc national de Yellowstone. (b) fumeurs noirs, dorsale pacifique.	04
<b>Figure 03</b>	<b>A :</b> Carte géographique du nord algérien sur laquelle la zone d'étude est indiquée par le cercle. <b>C :</b> Localisation de la source thermale Serguine( <b>Google Map consultée le 09/05/2020</b> ).	10
<b>Figure04</b>	site d'échantillonnage « source thermale de Serguine ». (Photos prises par une caméra de téléphone Sony Xperia 16 MPix).	11
<b>Figure 05</b>	cultures des différentes souches ( <b>S3, S8, S9, S29</b> ) sur gélose nutritive.	17
<b>Figure06</b>	observation des souches fongique isolées.	18
<b>Figure 07</b>	Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). Coloration de Gram ( <b>A: S3 , B :S8 ,C: S9 ,D:S29</b> ).Photos enregistrées par un microordinateur liée a un microscope photonique.	20
<b>Figure 08</b>	Substrats carbonés ( <b>Gal, Lac, Sach</b> ).	21
<b>Figure 09</b>	Test mannitol-mobilité.	22
<b>Figure 10</b>	Test du milieu ( <b>TSI</b> ).	22
<b>Figure 11</b>	Test de citrate.	23
<b>Figure 12</b>	Test ( <b>ADH,LDC,ODC</b> ).	25
<b>Figure 13</b>	Test de <b>VF+</b> (avec couche de glycérol) et <b>VF-</b> (sans couche glycérol).	26
<b>Figure 14</b>	résultats de l'activité enzymatique.	28

## Liste des tableaux

<b>Tableau N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page N°</b>
<b>Tableau 01</b>	aspect du mycélium des souches isolées.	19
<b>Tableau 02</b>	caractérisation cellulaire des isolats.	20
<b>Tableau 03</b>	utilisation des substrats carbonés.	23
<b>Tableau 04</b>	identification biochimique.	26
<b>Tableau 05</b>	pouvoir enzymatique.	29

## Résumé

Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles autochtones des environnements chauds tels que les sources thermales terrestres possèdent des capacités d'adaptations moléculaires intéressantes et constituent ainsi une importante source de molécules bioactives peu conventionnelles issues de mécanismes biochimiques et moléculaires uniques. Les enzymes hydrolytiques de ces organismes offrent des avantages majeurs et fournissent de nouvelles possibilités soit de l'amélioration ou de la création de nouveaux procédés biotechnologiques.

Dans la perspective d'étudier une partie de leur potentiel enzymatique, 04 souches bactériennes thermophiles ont été isolées à partir d'échantillons d'eau prélevés dans une zone thermique de l'Ouest algérien (hammam Serguine-Tiaret).

Une caractérisation phénotypique a été réalisée, et a permis d'avoir accès à certaines propriétés morphologiques et biochimiques de ces microorganismes. Cinq types d'activités hydrolytiques ont été recherchés par l'utilisation des différents substrats.

Ces souches isolées se caractérisent par l'efficacité de leurs enzymes dans la dégradation des sucres, des lipides, et des protéines ainsi que la cellulose.

Les souches isolées appartiennent à trois types d'actinomycètes : **Micromonospora sp**, **Laceyella sp**, **Streptomyces sp**

**Les mots clés :** Screening, activité enzymatique, source thermique, thermophiles.



## **Abstract**

Thermophilic and hyperthermophilic microorganisms inhabiting hot environments such as terrestrial hot springs have interesting molecular adaptation capacities and constitute an important source of bioactive molecules emerging from unique molecular and biochemical mechanisms. Hydrolytic enzymes of these organisms offer major advantages and give new possibilities to ameliorate existing processes or to create new ones.

With the purpose of studying some of their enzymatic potentials, 04 thermophilic, bacteria strains were isolated from water it was collected from a thermal zone in the Algerian west (hammam Serguine-Tiaret).

Phenotypic characterization has been realized, and allowed to obtain some morphological and biochemical proprieties of these microorganisms, five types of hydrolytic activities were investigated by using seven different substrates.

These isolated strains are characterized by their enzyme activity and their ability to be sugars, proteins, fats, proteins and cellulose.

Isolated strains belong to three types of actinomyces : **Micromonospora sp** , **Laceyella sp** , **Streptomyces sp**

**Key words:** Screening ,enzymatic activity , thermal source , thermophilic.

## ملخص

البكتيريا المحبة للحرارة والجد محبة للحرارة والتي تتخذ من البيئات الحارة موطنها كالينابيع المعدنية الساخنة حيث تملك القدرة على التكيف بهذه الأوساط، كما تعتبر مصدرا هاما للمركبات الطبيعية ذات النشاط الحيوي، كما أن انزيمات الاماهة التي تفرزها هذه الكائنات تملك مقومات هامة حيث يمكنها المساهمة في تحسين العمليات البيوتكنولوجية أو استحداث أخرى جديدة .

و من أجل هذا الغرض , تم عزل 04 سلالات بكتيرية محبة للحرارة من عينات ماء تم جلبها من حمام معدني يقع في الغرب الجزائري (حمام سرغين بتيارت) .

دراسة الخصائص الظاهرية لهاته السلالات سمحت بتحديد بعض خصائصها المورفولوجية و البيوكيميائية ، هاته المعطيات سمحت بتجميع السلالات حسب نسبة تشابهها، كما تم البحث عن خمسة انواع من انزيمات الاماهة باستخدام سبعة مركبات مختلفة .

تتميز هاته السلالات المعزولة بفعالية نشاطها الانزيمي و قدرتها على اماهة السكريات ، البروتينات، الدسم و السيليلوز تنتمي السلالات المعزولة الى 03 انواع من الاكتينومييسيت :

**Micromonospora sp , Laceyella sp, Streptomyces sp**

**الكلمات المفتاحية :** بحث، النشاط الانزيمي ، مصدر حراري ، محبة للحرارة.

## **Table des matières**

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

RESUME

**INTRODUCTION** .....01

### **Chapitre I: Revue bibliographique**

I.1 Bactéries thermophiles.....	02
I.2 Phylogénie des thermophiles.....	02
I.3 Les sources hydrothermales.....	03
I.4 Biotopes thermophiles .....	03
I.4.1 Biotopes naturels .....	04
I.4.1.1 Biotopes marins.....	04
I.4.1.2 Biotopes terrestres.....	04
I.4.2 Biotopes artificiels .....	05
I.5 Diversité taxonomique des thermophiles.....	05
I.6 Adaptation physiologiques à la thermophile.....	05
I.6.1 Protéines.....	05
I.6.2 Lipides .....	06
I.6.3 Acides nucléiques.....	06
I.7 Applications biotechnologiques.....	06
I.7.1 Applications basées sur les biomolécules .....	07
I.7.1.1 Enzymes.....	07
I.7.1.1.1 Enzymes des acides nucléiques.....	07
I.7.1.1.2 Estérases.....	07

I.7.1.1.3 Enzymes dégradant les polysaccharides.....	08
I.7.1.1.4 Protéases.....	08
I.7.2 Applications basées sur les cellules entières.....	08
I.7.2.1 Biolixiviation des métaux.....	08
I.7.2.2 Piles à combustible microbienne.....	08
I.7.2.3 Production d'hydrogène.....	09

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

II.1 Sources thermales étudiées et Echantillonnage.....	10
II.2 Isolement, purification et conservation des isolats.....	11
II.3 Caractérisation morphologique et culturale.....	12
II.4 Caractérisation physiologique et biochimique.....	12
II.4.1 Utilisation de substrats carbonés.....	12
II.4.1.1 Utilisation du citrate.....	12
II.4.1.2 Test Mannitol-Mobilité.....	12
II.4.1.3 Utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron.....	13
II.4.1.4 Dégradation des sucres.....	13
II.5 Mise en évidence des enzymes respiratoires.....	13
II.5.1 Catalase.....	13
II.5.2 Cytochrome oxydase.....	13
II.5.3 Caractérisation du type respiratoire.....	14
II.5.4 Recherche de la $\beta$ -galactosidase.....	14
II.5.5 Production de décarboxylases et de l'arginine dihydrolase.....	14
II.6 Mise en évidence d'activité hydrolytique extracellulaire.....	14
II.6.1 Amylase.....	14

II.6.2 Protéase.....	15
II.6. 2.1 Hydrolyse de la gélatine.....	15
II.6.2.2 Hydrolyse de la caséine.....	15
II.6.3 Activité lipolytique.....	15
II.6.3.1 Hydrolyse des Tween 20 et 80.....	15
II.6.3.2 Hydrolyse de l'huile d'olive.....	15
II.6.4 Cellulase.....	16

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

III.1 Isolement et purification des isolats.....	17
III.2 Caractérisation phénotypique.....	18
III.2.1 Observation macroscopique.....	18
III.2.2 Observation microscopique.....	19
III.3 Caractérisation biochimique .....	21
III.3. 1 Utilisation des substrats carbonés.....	21
III.3.1.1 Des substrats carbonés (galactose, lactose et saccharose).....	21
III.3.1.2 Test Mannitol-Mobilité.....	21
III.3.1.3 Test du milieu TSI (Triple Sugar Iron).....	22
III.3.1.4 Utilisation de citrate.....	23
III.3.2 Production de décarboxylases (ODC, LDC, et (ADH).....	24
III.3.3 Mise en évidence des enzymes respiratoires.....	25
III.3.3.1 Teste catalase et oxydase.....	25
III.3.3.2 Recherche de la $\beta$ -galactosidase (ONPG).....	25
III.3.3.3 Teste de type respiratoire (Viande de foie).....	25
III.3.4 Pouvoir enzymatique.....	26
<b>CONCLUSION</b> .....	30

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **ANNEXES**

# ***Introduction***

# INTRODUCTION

---

L'Algérie est un pays riche par sa diversité écologique et géologique. Il existe des écosystèmes extrêmes tels que les sebkhas, les sols désertiques et les sources chaudes, exploitées pour leurs bienfaits, notamment thérapeutiques. Cependant, ces sources n'ont été que très peu étudiées d'un point de vue biodiversité et ce n'est que récemment qu'on a commencé à s'intéresser aux microorganismes habitants ces environnements.

Les extrêmophiles sont des microorganismes qui possèdent des possibilités d'applications dans plusieurs domaines, incluant l'agriculture, l'industrie, la pétrochimie et la bioremédiation des sols...etc. Les microorganismes thermophiles se développent de façon optimale à des températures supérieures à 50°C, sont parmi les extrêmophiles les mieux étudiés, isolés de différents environnements, leurs enzymes extrêmement thermostables ont trouvés plusieurs applications à cause de leurs propriétés dépassant celles de leurs contreparties mésophiles.

Notre travail est une contribution à l'étude de la diversité microbiologique d'une source thermale située dans la wilaya de Tiaret et un screening enzymatique des souches isolées pour voir le potentiel hydrolytique de ces souches.

La présente étude s'articule autour de deux parties :

La première partie est une synthèse bibliographique sur les bactéries thermophiles, leurs enzymes et ces utilisations.

La deuxième partie représente le volet expérimental qui décrit les étapes d'isolement et identification des bactéries thermophiles, la détermination de la capacité d'hydrolyse de ces bactéries des différentes substances (amidon, caséine, lipide...). En suites une exposition des résultats obtenus, suivi d'une discussion à la lumière des données de la littérature.

Enfin, une conclusion générale et des perspectives qui sont un ensemble de réflexions achèvent ce travail.

**Chapitre I :**  
**Revue bibliographique**



### I.1 bactéries thermophiles

Selon la définition de THOMAS BROCK « un thermophile est un être vivant dont la température optimale de croissance se situe au-dessus de 60°C », respectivement. Ces micro-organismes sont retrouvés dans des habitats géothermiques naturels largement répandus sur notre planète et souvent associés à des zones tectoniques actives. Ces écosystèmes peuvent avoir une origine : géothermique terrestre, hydrothermale océanique profonde et pétrolière. (Madigan et al., 2007).

- Une autre définition plus pratique et plus large a été proposée « les organismes thermophiles sont tous les êtres vivants qui se développent à des températures supérieures à 45 °C », Cette dernière définition est intéressante car elle définit 3 sous catégories :

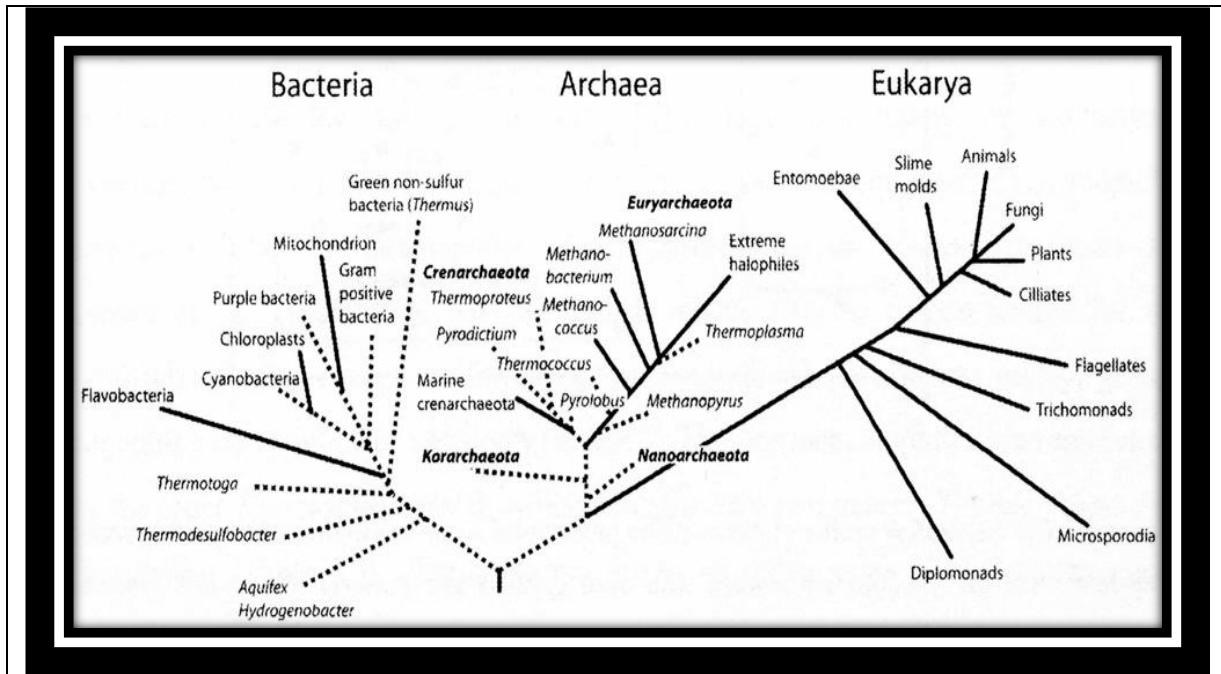
- **Thermophiles modérés** dont les conditions optimales de croissance se situent entre 55 et 65°C.

- **Thermophiles extrêmes** : la température optimale de croissance est comprise entre 65 et 80°C.

- **Hyper thermophiles** : la température optimale de croissance est supérieure à 80°C.

### I.2 Phylogénie des thermophiles

Les études phylogénétiques des bactéries thermophiles basées sur l'analyse de l'ARN ribosomal 16S (Querellou *et al.*, 2010). Ces travaux de phylogénie moléculaire sont à l'origine d'une avancée scientifique majeure datant de la fin des années 1970 : la découverte par CARL WOESE des Archea, troisième domaine du vivant avec les EUCARYA et BACTERIA.



**Figure 1** : Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative de séquences de gènes ribosomiques. Ces données soutiennent la discrimination entre les trois domaines, deux d'entre eux contenant des représentants procaryotes (*Bacteria* et *Archaea*). L'enracinement représente la position supposée du dernier ancêtre commun universel. Les groupes phylogénétiques contenant des membres thermophiles ou exclusivement thermophiles sont indiqués en lignes pointillées (Madigan et al., 2003) ; (Hobel et al., 2004).

### I.3 Les sources hydrothermales

Elles sont le résultat de l'activité volcanique aux niveaux des dorsales océaniques. Le mouvement des plaques tectoniques dans ces zones provoque une remontée du magma à quelques kilomètres de profondeur.

Ces zones sont le siège de phénomènes hydrothermaux. Chargée en métaux, l'eau émerge soit au niveau de sites océaniques profonds, de sites marins côtiers ou de sites terrestres. Ces deux derniers sont connus depuis fort longtemps car ils sont le siège de phénomènes spectaculaires comme les solfatares (Solfatara (Italie), Açores), les geysers (Parc de Yellowstone (USA), LA MER MORTE, les Kouriles (Russie), Afrique) (Corliss et al., 1979).

### I.4 biotopes thermophiles

Les biotopes les plus communs dans lesquels vivent les thermophiles sont d'origine géothermique. (Calteau, 2005).

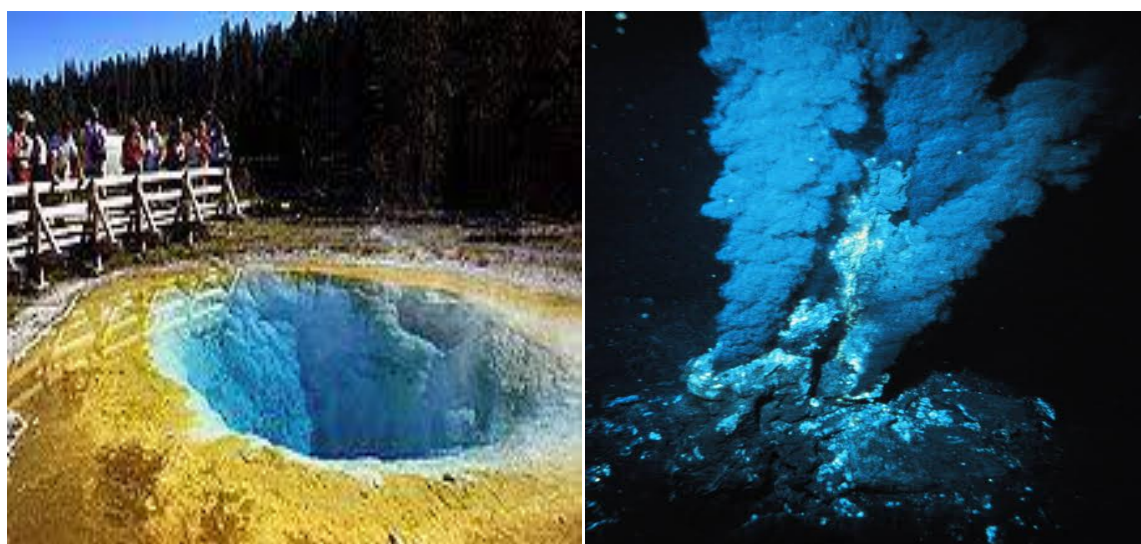
### I.4 .1 biotopes naturels

#### I.4 .1.1 biotopes marins

Les systèmes hydrothermaux océaniques quant à eux sont localisés au niveau des zones de fractures tectoniques. Au niveau des cheminées des fumeurs noirs, les émissions sont composées de fluide hydrothermal presque pur et peuvent atteindre une température de 350°C. (Huber *et al.*, 2000). C'est dans cette zone de mélange turbulent, entre le fluide hydrothermal toxique surchauffé et l'eau de mer oxygénée et froide, que se développe la vie hydrothermale (Figure 2.b) (Minic *et al.*, 2006).

#### I.4.1. 2 biotopes terrestres

Dans les systèmes terrestres, La nature de l'eau va dépendre des roches traversées et elle est généralement associée à une activité volcanique, la température de l'eau *in situ* sera fonction de la profondeur d'origine pour atteindre des températures inférieures à 100 °C et des pH acides ou basiques à la surface de la terre c'est le cas des sources chaudes localisées en Islande, en Algérie ou encore dans le Parc national de Yellowstone (Figure 2.a)(Gregoire *et al.*,2009).



**AB**

**Figure2:** (A) source chaude localisée dans le Parc national de Yellowstone (**Guide voyage du Parc Yellowstone**), (B) fumeurs noirs, dorsale pacifique(**Geyser sous-marin. Fosse des Caïmans, près de la Jamaïque, à 5000 mètres sous les mers.** © **CNRS Photothèque/ Jean-Louis Cheminée**).

### I.4.2 Biotopes artificiels

Les thermophiles sont localisées dans des différents systèmes thermiques artificiels par exemple les circuits d'alimentation et les réservoirs d'eau chaude, les usines géothermiques, les puits et forages de pétrole et les bioréacteurs.

### I.5 diversité taxonomique des thermophiles

Les micro-organismes thermophiles du domaine *Bacteria* possèdent des caractéristiques physiologiques et métaboliques très diverses incluent :

-**Des hétérotrophes** tels que les *Thermotogales* sont des thermophiles fermentaires et se développent mieux en anaérobiose lors de l'utilisation de thiosulfate comme accepteur d'électrons.

-**Des phototrophes** qui sont essentiellement les cyanobactéries qui effectuent la photosynthèse oxygénée (**Ferrera et al., 2007**).

-**Des chimio-litho- autotrophes** sont des bactéries capables de fixer le dioxyde de carbone en utilisant de l'énergie chimique comme Les bactéries de l'ordre *Aquificales* qui utilisent l'hydrogène, le soufre et le thiosulfate comme donneurs d'électrons et l'oxygène et/ou les nitrates comme accepteurs. (**Capdepuuy et al., 1995 ; Ferrera et al., 2007**).

### I.6 Adaptations physiologiques à la thermophilie

La vie à haute température est rendue possible par les thermophiles car elles ont subies de nombreuses adaptations physiologiques et biochimiques. Une analyse de biomolécules importantes chez les bactéries thermophiles a révélé des différences structurales subtiles dans les protéines, les acides nucléiques et lipides (**Alain et al., 2010**).

#### I.6. 1 Protéines

Les protéines des thermophiles et hyperthermophiles sont plus thermostables à haute température.

Les mécanismes intrinsèques les plus fréquemment rencontrés font appel à :

- une augmentation des interactions de Van der Waals et des interactions ioniques.
- une hydrophobicité accrue.
- une extension du nombre et de la taille des réseaux de liaisons hydrogène.
- une densité de compaction plus élevée.
- une diminution de la longueur des boucles de surface.
- une oligomérisation des protéines (**Holden et al., 2009; Quérellou et al., 2010**).

## Chapitre I: Revue bibliographique

---

Il existe de nombreux facteurs extrinsèques qui contribuent à la thermostabilité des protéines : Ils incluent des protéines chaperonnes (thermosomes) rencontrées chez les archées hyperthermophiles. Elles sont thermostables et résistantes à la protéolyse.

Les hyperthermophiles produisent également des osmolytes de nature non protéique ayant un rôle thermoprotecteur sur les protéines cytoplasmiques (**Santos *et al.*, 2011**).

### I.6.2 Lipides

L'une des caractéristiques les plus remarquables des archées concerne la structure chimique des lipides membranaires. Ceux des bactéries et des eucaryotes possèdent des constituants de base comme les phosphoglycérides qui contiennent des liaisons esters et une tête polaire et peuvent donc former des bicouches séparant deux compartiments aqueux. Les lipides d'archées sont caractérisés notamment par la présence de liaisons éthers entre le glycérol et les chaînes d'acides gras et par les propriétés originales des lipides tétraéther bipolaires leur permettant de générer des films monocouches stables.

Ces lipides bipolaires atypiques jouent un rôle important dans l'adaptation aux conditions extrêmes des milieux où prolifèrent les archées (**Rawlings *et al.*, 2007**).

### I.6.3 Acides nucléiques

Tous les hyperthermophiles produisent une ADN topoisomérase appelée ADN gyrase reverse. Cette topoisomérase provoque la formation de sur enroulement positif de l'ADN au contraire des ADN gyrases présentes chez tous les procaryotes non thermophiles (sur enroulement négatif) (**Madigan *et al.*, 2007**), et il est aussi responsable à la stabilisation de la double hélice d'ADN et la préservation de la dénaturation thermique.

## I.7 Application biotechnologique

On peut distinguer deux types d'applications différentes :

- L'une des premières applications possibles est la biolixiviation, utilisée essentiellement pour concentrer les métaux (cuivre, or et uranium) (**Williams *et al.* (2009)**).

- Le second type d'applications repose sur l'utilisation des biomolécules issues des extrémophiles. Ce sont les enzymes, mais aussi les protéines, les lipides, les polymères, et d'autres métabolites secondaires.

### I.7.1 Applications basées sur les biomolécules

Elles représentent la voie la plus commune d'utilisation des thermophiles, ses biomolécules comprennent essentiellement des enzymes, mais également d'autres substances de nature diverse.

#### I.7.1.1 Enzymes

Ces enzymes issues de microorganismes thermophiles ou hyperthermophiles tardent à être exploitées dans les procédés industriels, car elles ne répondent pas exactement aux besoins industriels ou que leur substitution aux enzymes classiques est trop coûteuse. Ces enzymes sont par contre largement employées en biologie moléculaire.

##### I.7.1.1.1 Enzymes des acides nucléiques

Les technologies de l'ADN recombinant reposent sur l'utilisation d'enzymes très diverses enzymes de restriction, ADN polymérase, ADN ligases, etc. Les ADN polymérase thermostables jouent un rôle fondamental dans les techniques d'ingénierie du vivant grâce leur aptitude à amplifier un gène donné à des millions de copies in vitro par PCR(Querellou *et al.*,1999), amplification isotherme, etc. L'enzyme la plus utilisée en PCR est la *Taq* polymérase isolée de la bactérie *Thermus aquaticus*. Plusieurs domaines sont plus particulièrement demandeurs de nouvelles ADN polymérase : le bioterrorisme, avec l'objectif de disposer d'ADN polymérase fonctionnelles dans des conditions drastiques (présence de solvants et autres inhibiteurs) (Palud *et al.*,2008).

##### I.7.1.1.2 Estérase

Les enzymes hydrolysant les ester pour donner un alcool et un acide carboxylique. Dans un solvant organique, elles peuvent catalyser la réaction inverse ou une trans-estérification.

-Les estérase se distinguent des lipases par leur préférence pour les chaînes carbonées courtes et ne sont pas actives sur les substrats qui forment des micelles.

-Elles ont trouvé de multiples applications dans les industries médicales, agroalimentaires, de production d'énergie, grâce à leurs propriétés en synthèse organique (d'arômes, de détergents, de biodiesel notamment),etc.

Depuis la caractérisation de la première carboxylestérase de *Sulfolobus acidocaldarius*, en 1988, de nombreuses estérase d'archées ont été isolées. La première lipase ne l'a été que récemment isolé, chez l'archée hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus* (Levisson *et al.*, (2009).

### **I.7 .1.1.3 Enzymes dégradant les polysaccharides**

Les enzymes de la famille des glycosylases, impliquées dans le métabolisme des glucides, revêtent un intérêt industriel important. En particulier, celles qui convertissent l'amidon et celles capables de dégrader la cellulose et la lignocellulose sont fondamentales dans les procédés de production de biocarburants.

(Egorova *et al.*, 2007).

### **I.7 .1.1.4 protéases**

Les protéases sont particulièrement importantes en raison de leur utilisation répandue dans l'industrie laitière et les détergents. Dans l'industrie laitière, les protéases jouent un rôle lors du caillage du lait dans la production du fromage ; elles peuvent aussi influencer le goût des produits. Au niveau de détergents, elles permettent l'élimination des taches de nature protéique. Les protéases ont aussi des applications dans les domaines de l'alimentation, du textile, du tannage et des pâtes et papiers. Dans ce dernier champ d'application, elles sont employées pour le blanchiment des pâtes et le nettoyage des équipements (élimination de biofilm) (Barnabe *et al.*, 2003 ; Kirk *et al.*, 2002).

### **I.7.2 Applications basées sur cellules entières**

Il s'agit d'applications pour lesquelles l'utilisation de biomolécules purifiées à partir des cultures est non rentable ou d'applications qui requièrent l'action directe d'une population microbienne, voire d'un mélange complexe de différentes espèces :

#### **I.7.2.1 Biolixiviation des métaux**

La lixiviation microbienne ou biolixiviation est utilisée essentiellement pour concentrer les métaux (cuivre, uranium) lorsque les concentrations initiales du minerai sont faibles et que les procédés chimiques conventionnels ne sont pas rentables.

Toutefois, l'oxydation biologique des composés sulfurés inorganiques réduits est importante pour limiter leur contribution à la création d'un film de passivation à la surface des métaux qui réduirait les rendements d'extraction. Cette passivation est éliminée lorsque la biolixiviation est effectuée à haute température avec des espèces thermo-acidophiles. (Rawlings *et al.*, 2007).

#### **I.7.2.2 Piles à combustible microbienne**

Récemment, il a été démontré qu'une communauté microbienne thermophile isolée de sédiments marins était capable de produire un courant électrique dans une pile à combustible fonctionnant à 60 C ° en utilisant de l'acétate comme carburant (Mathis *et al.*, 2008).

### I.7.2.3 Production d'hydrogène

Il y a un intérêt croissant pour l'utilisation des sources renouvelables afin de satisfaire les besoins énergétiques mondiales de plus en plus conséquentes. Les produits de la fermentation anaérobie incluent l'éthanol, le méthane et l'hydrogène. La recherche sur la production biologique d'hydrogène est devenue attrayante pour des utilisations possibles du biohydrogène comme source d'énergie propre. La voie de production du biohydrogène dépend de l'approvisionnement en substrats organiques et pourrait idéalement être adaptée à une production d'énergie accouplée avec un traitement des déchets organiques (**Antranikian,2008**).



**Chapitre II :**  
**Matériels et méthodes**

### II. Matériels et méthodes

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé les matériels et les équipements de laboratoire de microbiologie(voir l'annexe 01).Ce travail a été réalisé au laboratoire de reproduction des animaux de la ferme à l'Université de Tiaret pour une durée de 2 mois allant de février à Mars 2020.

#### ➤ Objectif du travail

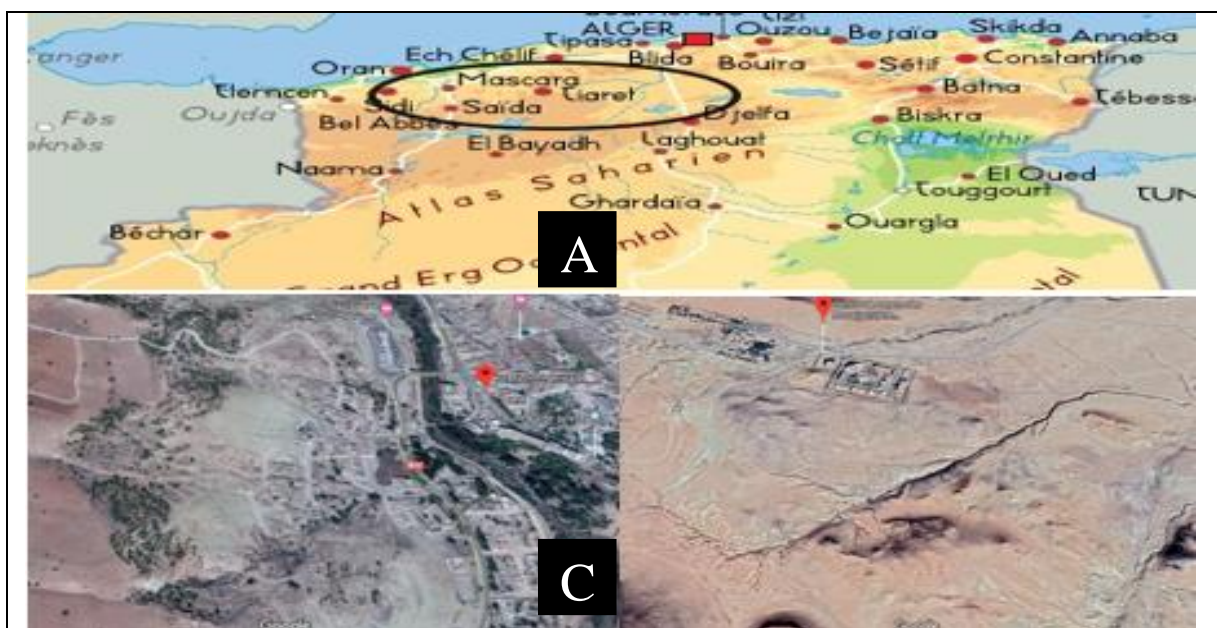
Notre étude consiste à caractériser la flore microbienne existante dans les eaux thermales de hammam Serguine, tout en mettant en évidence la capacité de ces souches à sécréter des enzymes d'intérêt biotechnologique primordiale.

#### II.1 Les sources thermales étudiées et Echantillonnage

Les échantillons d'eau ont été prélevés à partir d'un point d'eau situé à hammam Serguine.

#### ➤ Description de la zone d'étude

**Hammam Serguine** est situé à 141 km au Sud-est du Chef-lieu de la Wilaya de Tiaret : Le site comprend 2 sources d'eaux thermales à des températures de 37 à 39.5°C au point d'émergence. Elles sont de types soufrées, calciques, sulfatées, chlorurées et sodiques. (Seurat et Frémy., 1937).



**Figure 03 : A :** Carte géographique du nord algérien sur laquelle la zone d'étude est indiquée par le cercle. **C :** Localisation de la source thermale Serguine(Google Map consultée le 09/05/2020).

### ➤ Echantillonnage

Les échantillons d'eau ont été prélevés entre Février et mars 2020 à partir de cinq points pour avoir un échantillon représentatif. Les échantillons d'eau sont prélevés à 20-30 cm de la surface dans des flacons stériles et transportés dans une glacière à 4°C vers le laboratoire.



**Figure 4** : site d'échantillonnage « source thermique de Serguine ». (Photos prises par une caméra de téléphone Sony Xperia 16 MPix).

### II.2 Isolement, purification et conservation des isolats

L'isolement des souches a été effectué sur six milieux de culture solides différents (gélose nutritif, milieu mannitol-mobilité, milieu TSI, milieu de base, milieu de citrate simmons, gélose viande-foie) (voir l'**annexe03**), Ces derniers sont peu sélectifs et conçus pour cultiver le plus grand nombre de bactéries possibles. On ajoute à un milieu de culture de l'Agar-Agar pour le rendre solide, le pH est ajusté à 7,4 à l'aide d'une solution de NaOH et l'incubation est faite à 44°C. Ces conditions sont les plus couramment utilisés pour l'études des bactéries thermophiles (**Yavuzl et al., 2004 ; Good Fellow et Jones, 2009 ; Logan et al., 2009**).

Pour les échantillons d'eau, ont subis une série des dilutions décimales.

## Chapitre II : Matériels et méthodes

---

L'isolement est effectué par étalement de 1 ml de chaque dilution  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$ . L'incubation des boîtes de Pétri à 45°C pendant 24 à 72 heures.

De chaque milieu, environ une dizaine de colonies d'aspect différent est prélevée et purifiée par repiquages successifs sur les mêmes milieux solides. Les souches pures sont conservées à 4°C.

### II.3 Caractérisation morphologique et culturale

La détermination de l'aspect macroscopique des colonies (forme, pigmentation, taille, etc.) est effectuée après croissance sur milieu solide après une incubation de 24 à 72 heures à l'aide d'une loupe binoculaire. La morphologie, l'arrangement cellulaire et le Gram des isolats sont déterminés sur des cultures de 24 heures par la technique de coloration différentielle décrite par Gram (1884) à l'aide d'un microscope photonique (lié à un ordinateur).

### II.4 Caractérisation physiologique et biochimique

La composition chimique des milieux de culture pour l'analyse biochimique est rapportée dans l'**annexe 03**.

#### II.4.1 Utilisation de substrats carbonés

L'utilisation des substrats carbonés comme source unique de carbone et/ou d'énergie a été testée sur des différents milieux.

##### II.4.1.1 Utilisation du citrate

L'habilité des souches à utiliser le citrate comme seule source de carbone et d'énergie est testée sur le milieu citrate de Simmons. Le virage au bleu du milieu indique une réaction positive (**Harley et Prescott, 2002**).

##### II.4.1.2 Test Mannitol-Mobilité

La mobilité des souches ainsi que la fermentation du mannitol sont étudiées sur le milieu semi-solide Mannitol-Mobilité. La mobilité de l'isolat est interprétée par un envahissement du

milieu à partir de la pique d'inoculation et la fermentation du mannitol est traduite par un virage au jaune du milieu de culture (**Harley et Prescott, 2002**).

### II.4.1.3 Utilisation des sucres sur milieu (Triple Sugar Iron)

La fermentation du glucose avec production d'acide, l'oxydation du saccharose et/ou du lactose, la libération d'H<sub>2</sub>S et de CO<sub>2</sub> sont appréciées sur le milieu Triple Sugar Iron. La fermentation est interprétée par le virage de couleur du culot, l'oxydation par le virage de couleur de la pente, la libération de H<sub>2</sub>S par un noircissement sur le culot et de CO<sub>2</sub> par la présence des bulles dans le milieu (TSI)(**Harley et Prescott, 2002**).

### II.4.1.4 Dégradation des sucres

L'utilisation des sucres comme source unique de carbone et d'énergie est testé sur milieu MEVAG. Les sucres sont rajoutés à une concentration finale de 1 %. Le virage du milieu en jaune indique une réaction positive.

Les substrats testés sont : le galactose, le lactose et le saccharose.

## II.5 Mise en évidence des enzymes respiratoires

### II.5.1 Catalase

La catalase permet la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produit par la souche. Sa recherche consiste à mettre en contact une colonie d'isolat en présence d'eau oxygénée à 10 volumes. Une effervescence due à un dégagement gazeux traduit la présence de cette enzyme (**Joffin et Leyral, 2006**).

### II.5.2 Cytochrome oxydase

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. 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**).

### 5.3 Caractérisation du type respiratoire

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, le glycérol est ajouté sur la gélose. La lecture se fait après 24h d'incubation, l'apparition des colonies indique un résultat positif.

### 5.4 Recherche de la $\beta$ -galactosidase

A une suspension dense des bactéries testées en eau distillée stérile, un disque imprégné d'Ortho-Nitro-phényl- $\beta$ -Galactoside (ONPG) est ajouté puis incubée à 45°C pendant 30 à 60 minutes. L'apparition d'une couleur jaune indique l'hydrolyse de l'ONPG et donc la présence d'une  $\beta$ -galactosidase (Joffin et Leyral., 2006).

### 5.5 Production de décarboxylases et de l'arginine dihydrolase

Les activités enzymatiques de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH) sont examinées en anaérobiose, sur le bouillon de Moeller à partir d'une suspension dense de culture. Une activité positive est interprétée par une couleur violette (alcalinisation du milieu) et l'absence d'enzyme est exprimée par un virage au jaune (acidification du milieu) (Joffin et Leyral., 2006).

## II.6 Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

Les isolats sont soumis à une recherche qualitative d'hydrolases extracellulaires à 45°C. Un milieu gélosé est modifié par réduction de la source organique par milieu de base qui compose (3g de l'Agar-Agar, 16g de peptone, 0.8g de extrait de levure et 200ml d'eau distillée) et l'addition du polymère-test (Demirjian *et al.*, 1999 ; Tholey et Heinzl, 2002).

### II.6.1 Amylase

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).

### II.6.2 Protéases

#### II.6.2.1 Hydrolyse de la gélatine

Le milieu de base est additionné de 0,4% (p/v) de gélatine. L'incubation est effectuée pendant 1 à 2 jours et la lecture se fait en rinçant les boîtes avec le réactif de Frazier, L'hydrolyse de la gélatine est indiquée par l'apparition de zones claires autour des stries (**Frazier, 1926**).

#### II.6.2.2 Hydrolyse de la caséine

Le milieu de base est modifié par addition de 1% (p/v) de caséine. Après ensemencement, les souches testées sont incubées pendant 1 à 2 jours. La présence d'une activité caséinolytique se manifeste par la présence d'un halo clair autour des colonies suite à l'hydrolyse de ce polymère (**Priest *et al.*, 1988**).

### II.6.3 Activités lipolytiques

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.

#### II.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 lipases (**Sierra, 1957**).

#### II.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 spots 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 spots (**Sigurgisladottiret *et al.*, 1993**).

### II.6.4 Cellulase

Le milieu de base supplémenté par 0,5% (w/v) de carboxyméthylcellulose (CMC) est utilisé pour sélectionner les souches bactériennes ayant une activité cellulolytique. Les boîtes sont incubées à 45 °C pendant 48h. Après incubation, les boîtes de Pétri sont remplies d'une solution de rouge Congo à 0,1% (w/v) et placées pendant 15 à 30 min à 45 °C. Les boîtes sont lavées par une solution de NaCl 1M pendant 5 à 10 minutes à température ambiante avant la lecture. La production de cellulase est appréciée par l'apparition de zones claires autour des colonies (**Bragger *et al.*, 1989**).



***Chapitre III :***  
***Résultats et Discussion***

### III.1 Isolement et purification des isolats

Le bouillon d'enrichissement utilisé pour l'isolement, après 48 heures d'incubation, a montré la présence d'une population bactérienne dans l'échantillon d'eau thermale étudié, cela se traduit par l'apparition d'un trouble.

L'ensemencement sur gélose nutritive et les repiquages successifs effectués ont permis de sélectionner une gamme de 60 souches dont nous avons choisi 04 souches, désignées selon un code composé de lettres et de numéros (S3, S8, S9, S29). Elles ont montré une meilleure croissance sur gélose nutritive (colonies apparaissent au moins de 24 h d'incubation) cependant, il n'y avait que peu de diversité dans la morphologie des colonies (**figure05**).



**Figure 05:** cultures des différentes souches(S3, S8, S9, S29) sur gélose nutritive.

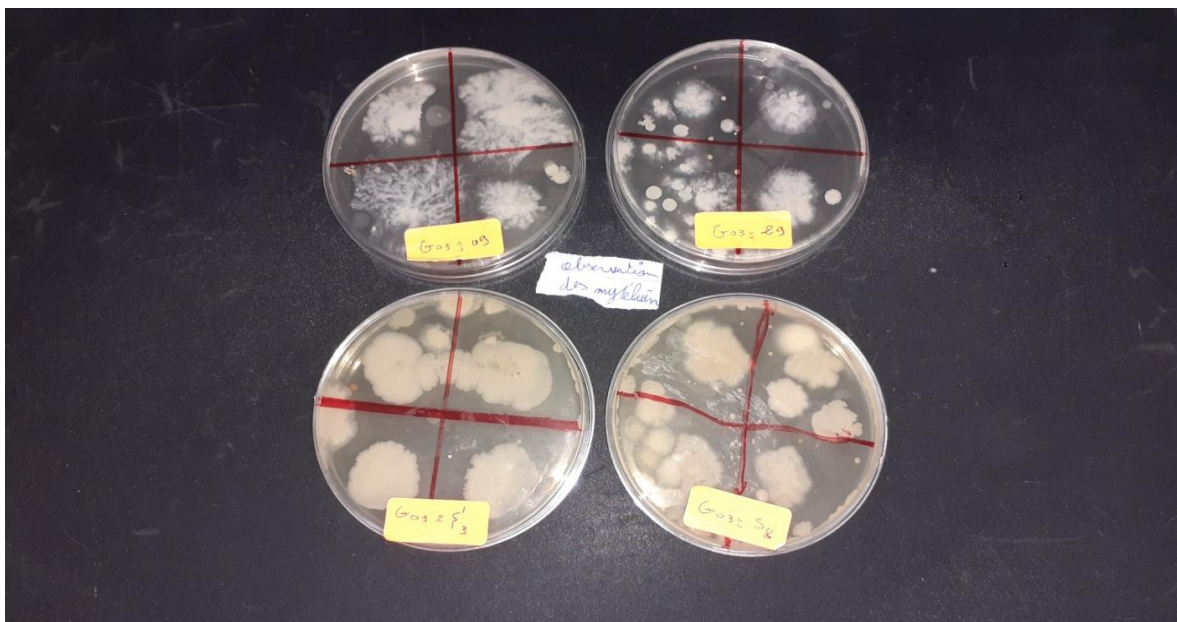
### III.2 Caractérisation phénotypique

#### III.2.1 Observation macroscopique

Les caractères macroscopiques des différentes souches isolées sont étudiés sur la gélose nutritive, le plus communément utilisé à cet effet (**Botton *et al.*, 1990**).

**Le tableau 01:** résume l'aspect du mycélium des souches isolées (**figure06**), la surface et la croissance des colonies, la couleur du revers de la boîte ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche.

Donc on observe une meilleure croissance des 04 souches sur la gélose nutritive.



**Figure06 :** observation des souches isolées.

## Chapitre III : Résultats et Discussion

**Tableau 1** : l'aspect du mycélium des souches isolées.

Souche	Fructification	Mycélium de substrat	Caractéristiques des colonies.	Surface	Pigment au revers de la boîte.
S3	Marron sable	Blanchâtre à jaune	Velouté ou parfois floc	Plane	Jaune
S8	Marron sable	Blanchâtre à jaune	Velouté ou parfois floconneuse.	Plane	Jaune
S9	Vert sombre et gris verdâtre Plane Pale virant au Jaune	Blanchâtre à gris	Velouté mais surélevé et floconneux au centre souvent zoné granuleuse	Plane	Jaune
S29	Vert sombre et gris verdâtre Velouté mais surélevé et floconneux au centre souvent zoné granuleuse Plane Pale virant au Jaune	Blanchâtre à gris	Velouté mais surélevé et floconneux au centre souvent zoné granuleuse	Plane	Jaune

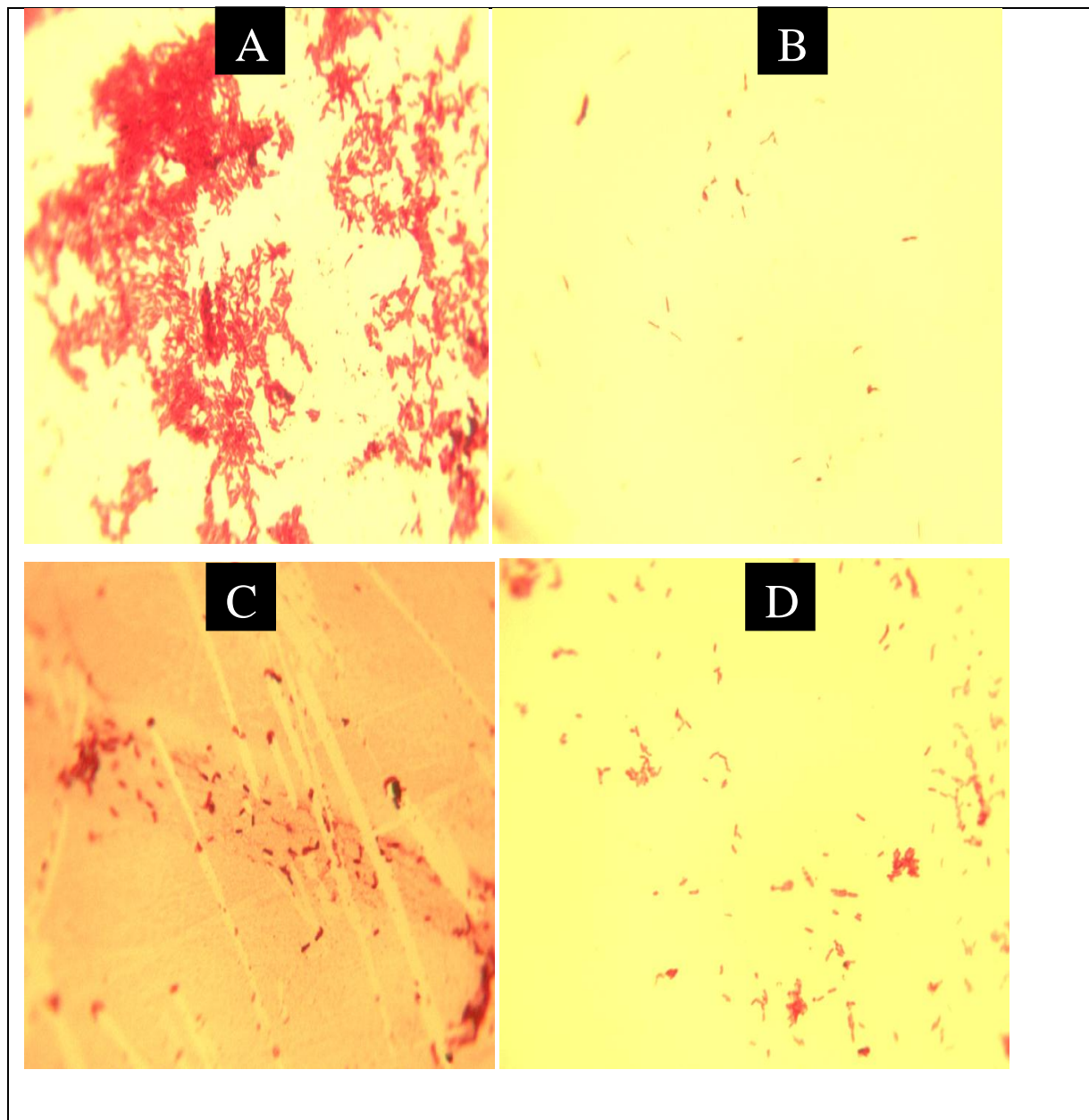
### III.2.2 Observation microscopique

L'examen microscopique a révélé les résultats représentés dans le **tableau 2**. Parmi les quatre isolats, les quatre souches sont des coccobacilles, Gram négatif, mobiles sauf (S9) qui est immobile, présentent des endospores, sauf (S8) exempté d'un endospore (**Figure 7**).

## Chapitre III : Résultats et Discussion

**Tableau 2:** caractérisation cellulaire des isolats

Souche	Forme de cellule	Gram	Couleur	Mobilité	Endospores
S3	coccobacille	-	Rose	Mobile	+
S8	coccobacille	-	Rose	Mobile	-
S9	coccobacille	-	Rose	Immobile	+
S29	coccobacille	-	Rose	Mobile	+



**Figure 7 :** Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). Coloration de Gram (A: S3 , B:S8 ,C: S9 ,D:S29).Photos enregistrées par un microordinateur liée à un microscope photonique.

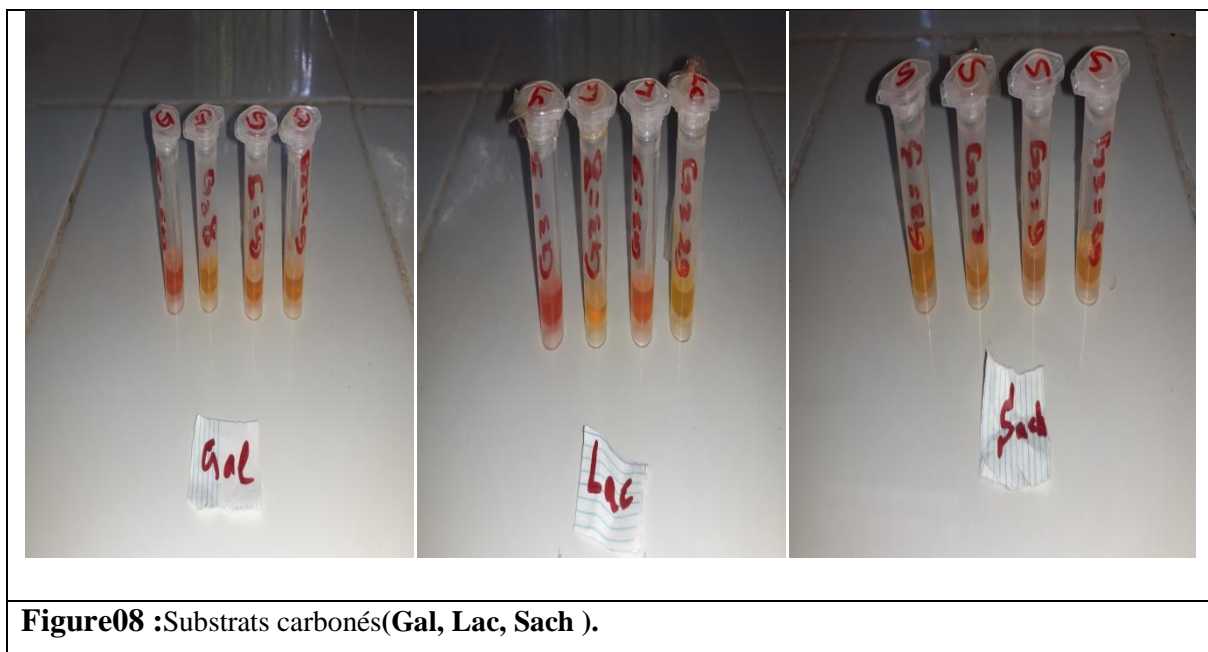
### III.3 Caractérisation biochimique

#### III.3. 1. Utilisation des substrats carbonés

Les résultats de croissance sur les différents substrats testés comme unique source de carbone, sont présentés dans le **tableau 3**. Les sucres sont les plus assimilés par les isolats et il en ait de même du mannitol, Le citrate est le seul acide organique assimilé par quelques isolats.

##### III.3. 1. 1 Des substrats carbonés (galactose, lactose et saccharose)

La plupart des souches sont capables de fermenter le glucose, le lactose et saccharose (**figure8**).

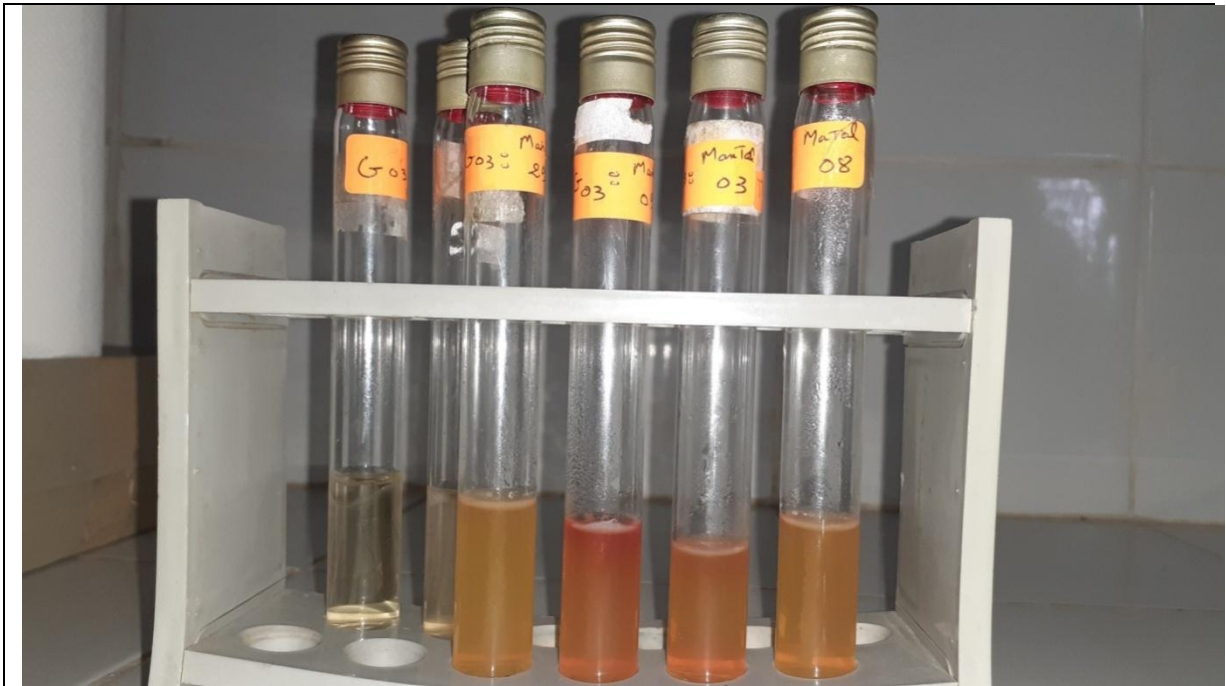


**Figure08** :Substrats carbonés(Gal, Lac, Sach ).

##### III.3.1.2 Test Mannitol-Mobilité

Généralement le mannitol est utilisé pour tester la mobilité et la production d'acides et dégagement des gaz par les bactéries.

La fermentation du mannitol a été observée chez 02 souches (S8, S9). Un virage faible de l'indicateur au jaune a également été noté (**figure09**). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'acidification produite par les bactéries aérobies strictes est, en général insuffisante face à l'importance du pouvoir tampon du milieu (**Joffin et Leyral, 2006**).



**Figure09** :Test mannitol-mobilité

### III.3.1.3 Test du milieu TSI (Triple Sugar Iron)

La fermentation du glucose avec production d'acide, l'oxydation du saccharose et/ou du lactose, la libération d' $H_2S$  et de  $CO_2$  sont appréciées sur le milieu Triple Sugar Iron (TSI)(Tabak et Bensoltane,2012).

D'après nos résultats, nous avons constaté que la souche (S3) a dégradé seulement le glucose, alors que les souches S8, S9, S29 ont dégradé les trois sucres (**figure10**).



**Figure10** :Test du milieu (TSI).

### III.3.1.4 Utilisation de citrate

Ce test permet de déterminer la capacité des bactéries à utiliser le citrate Simmons comme seule source de carbone avec alcalinisation de milieu ou non, (c'est-à-dire les bactéries possèdent le citrate perméase ou non).

Nos résultats montrent que la souche (S3) utilise le citrate Simmons comme seul source de carbone, alors que les autres souches (S8, S9, S29) n'utilisent pas le citrate comme source énergétique (**figure11**).



**Figure11** :Test de citrate.

**Tableau03** : utilisation des substrats carbonés

Souche	Galactose	Saccharose	Lactose	Mannitol	Citrate	H2S	CO2
S3	-	+	-	-	+	-	-
S8	+	+	+	+	-	+	+
S9	-	+	-	+	-	+	+
S29	+	+	+	-	-	+	+



### III.3.2 Production de décarboxylases (ODC, LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH)

Les activités enzymatiques de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH) sont examinées en anaérobiose (glycérol). Une activité positive est interprétée par une couleur violette (alcalinisation du milieu) et l'absence d'enzyme est exprimée par un virage au jaune (acidification du milieu) (**Joffin et Leyral, 2006**).

Cette teste pour obtenu la dégradation des acides aminés ou non, coloration jaune (négatif) donc ne pas de dégradation des acides aminés, coloration violette (positif) alors la présence de la dégradation (**figure12**).

Les résultats de la recherche de la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et del'arginine dihydrolase sont donnés dans le **tableau 04**comme suite :

Test ADH « Tout les souche dégrader l'acide aminé (Arginine) par l'arginine dihydrolase».

Test LDC « les souche (S8, S9 et S29) ne dégrader pas l'acide aminé (Lysine) alors que la souche (S3) est capable de dégrader la Lysine par l'enzyme Lysine décarboxylase.

Concernant le teste ODC,la plupart des souches sont capables de dégrader l'ornithine par l'ornithine décarboxylase.

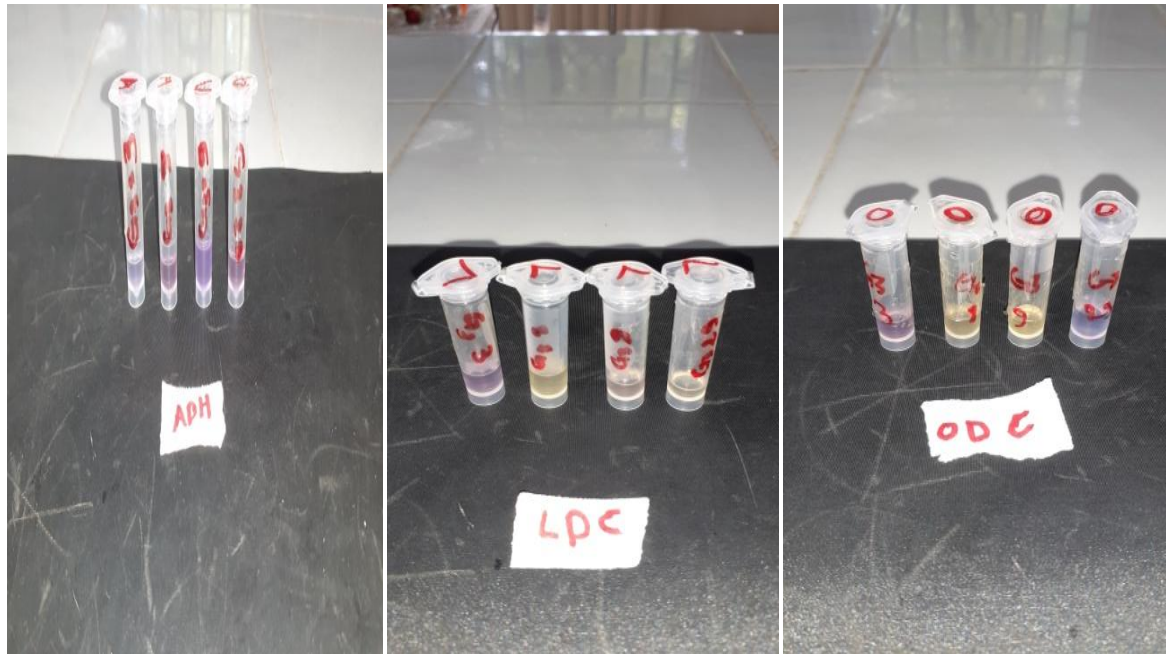


Figure12: Test (ADH,LDC,ODC).

### III.3.3 Mise en évidence des enzymes respiratoires

#### III.3.3.1 Test catalase et oxydase

Tout les isolats ont une catalase positive, alors qu'elles sont dépourvues d'oxydase.

La plupart des microorganismes aérobies possèdent au moins un de ces enzymes y compris les bactéries thermophiles (Singleton P, 2005 ; Joffin et Leyral, 2006).

#### III.3.3.2 Recherche de la $\beta$ -galactosidase (ONPG)

D'après nos résultats les quatre souches sélectionnées sont incapables d'hydrolyser l'ONPG, donc elles ne possèdent pas la  $\beta$ -Galactosidase.

#### III.3.3.3 test de type respiratoire (Viande de foie)

La détermination de type respiratoire permis d'établir une relation entre la souche et l'oxygène aérien c'est-à-dire, l'aptitude d'une bactérie de supporter la présence ou l'absence de l'oxygène.

D'après nos résultats, nous avons constaté que la souche S3 pousse à la surface de la gélose donc elle est aérobie stricte alors que les trois souches (S8, S9, S29) sont poussées en présence et en absence d'O<sub>2</sub> donc elles sont des aéro-anaérobies facultatives (figure13).

(Denis *et al.*, 2011).



**Figure13** :Test de **VF+** (avec couche de glycérol) et **VF-** (sans couche glycérol).

**Tableau 04** : Identification biochimique

souche	ADH	LDC	ODC	Catalase	Oxy	ONPG	VF+	VF-
<b>S3</b>	+	+	+	+	-	-	AS	-
<b>S8</b>	+	-	-	+	-	-	AAF	AAF
<b>S9</b>	+	-	-	+	-	-	AAF	AAF
<b>S29</b>	+	-	+	+	-	-	AAF	AAF

**AS** : Aérobié Stricte, **AAF** : Aéro-Anaérobie Facultative, **+**: réaction positive, **-** :réaction négative

### III.3.4 Pouvoir enzymatique

Dans notre étude, les activités hydrolytiques (protéolytiques, amylolytiques ,cellulolytiques et lipolytiques ) ont été mis en évidence après 24 heures d'incubation à une température de 45C°, en utilisant les milieux de culture différents (**figure14**).

Un screening des activités amylolytiques, protéolytiques, lipolytiques a été effectué. La présence de ces activités a été détectée en utilisant les substrats suivants : caséine, gélatine tween 20, tween 80, huile d'olive et amidon, respectivement. Les résultats sont présentés dans le **tableau 05**.

### Chapitre III : Résultats et Discussion

---

D'après nos résultats, nous avons remarqué que nos souches possèdent un bagage enzymatique très développé, la souche S3 et S8 sont capables d'hydrolyser tout les substrats analysées, donc on peut dire qu'elles possèdent une activité amylolytique protéolytique et lipolytique.

Cependant, les souches S9 et S29 sont incapables de dégrader l'huile d'olive.

Selon (**Bertoldo et Antranikian., 2002**), les bactéries thermophiles produisent une gamme très développée d'enzymes hydrolytiques (protéase, cellulase, amylase, glucosidase, glucoamylase, pullulanases, cyclodextrine glycosyltransferase). Elles sont également capables de dégrader d'autres polysaccharides tels que le glycogène de différentes sources ( animales ou microbiens).

Plusieurs études en prouvent que les microorganismes thermophiles sont des meilleures sources d'enzymes thermostables (**Salameh et Wiegel, 2007; Turner, 2007 ; Stathopoulou *et al.*, 2013**).

La stabilité thermique de ces enzymes considérées comme un critère de choix dans les domaines industrielles. Ces enzymes offrent plusieurs avantages dans la zone d'utilisation. Ils augmentent la solubilité du substrat, le taux de diffusion et réduisent la viscosité et le risque de contamination.

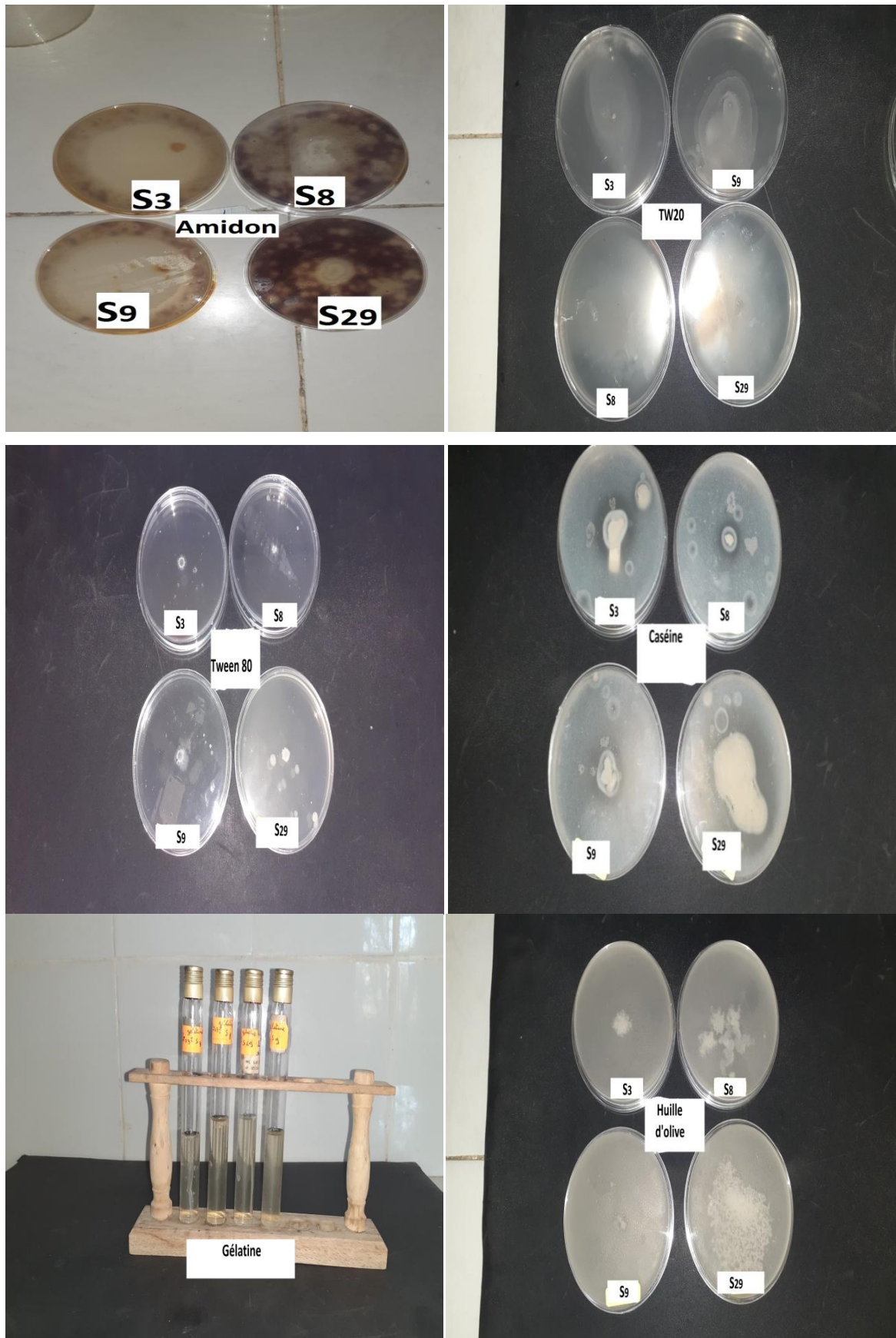


Figure14 : résultats de l'activité enzymatique.

## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

**Tableau 05:** Pouvoir enzymatique des souches.

<b>Souche</b>	<b>Amidon</b>	<b>Tw20</b>	<b>Tw80</b>	<b>Caséine</b>	<b>Gélatine</b>	<b>Cellulose</b>	<b>Huile d'olive</b>
<b>S3</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>S8</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>S9</b>	+	+	+	+	+	+	-
<b>S29</b>	+	+	-	+	+	+	-

**Conclusion générale**

**et**

**perspectives**

## CONCLUSION

---

Les organismes vivant en milieux extrêmes et en particulier les thermophiles présentent un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans ces conditions, mais aussi de se développer souvent de manière optimale. L'intérêt porté à ces microorganismes a abouti à la découverte d'une diversité inouïe, complètement inattendue, dans des milieux supposés hostiles à la vie. Egalement, les propriétés singulières de leurs biomolécules à savoir les enzymes ont très vite attiré l'attention des biotechnologues.

L'objectif essentiel de ce travail est de faire un isolement des souches thermophiles à partir d'échantillons d'eau du hammam Serguine, et aussi faire un screening enzymatique de ces souches.

L'isolement et l'identification de ces souches est effectué dans des milieux non sélectifs (la température d'incubation est considérée comme moyen de sélectivité).

La mise en évidence de l'activité enzymatique par les 04 souches bactériennes sélectionnées à 45°C, a été réalisée sur le même milieu d'isolement avec l'addition d'un substrat spécifique pour chaque enzyme recherché.

D'après les résultats recueillis, nous pouvons conclure que, les souches sélectionnées sont des coccobacilles, Gram négatif, mobile (sauf S9), catalase positif, oxydase négatif.

Sur le plan de la production d'enzymes, il est intéressant de signaler que parmi les souches sélectionnées, plus que la moitié des souches possèdent des activités hydrolytiques combinées, c'est-à-dire capables d'hydrolyser plus que deux substrats d'où leur importance biotechnologique.

Le screening enzymatique a permis la mise en évidence de 04 types d'hydrolases extracellulaires. Dans ce but, 7 différents substrats ont été utilisés : amidon, cellulose, caséine, gélatine, Tween 20, Tween 80 et l'huile d'olive, pour la détermination des activités amylolytiques, cellulolytiques, protéolytiques et lipolytiques.



## CONCLUSION

---

En fin, ce travail a permis l'exploitation d'un biotope extrême (Hammam serguine ), ce Hammam possédant un optimum de température de 37 à 39.5 °C.

Les thermophiles possèdent des activités intéressantes pour la bio-industrie et pour exploiter ce domaine, une étude détaillée doit être réalisée sur ces souches pour renforcer leur potentiel biotechnologique, une optimisation supplémentaire des paramètres de croissance pour une activité enzymatique extracellulaire optimale peut être réalisée, leurs gènes peuvent être identifiés et clonés pour produire des enzymes recombinantes et ensuite utilisés pour la production à l'échelle industrielle.

**Références**  
**Bibliographiques**

### A

**Antranikian G., 2008.** Industrial relevance of thermophiles and their enzymes in: Thermophiles, biology and technology at high temperatures. Ed. Robb F., Antranikian G., Grogan D., Driessen A. 8:114-147. CRC Press, New York.

**Alain K., Geslin C., Godfroy A., Prieur D., 2010.** Les thermophiles [en ligne] [https://wwz.ifremer.fr/content/download/12612/file/fiche\\_big2010\\_thermophiles](https://wwz.ifremer.fr/content/download/12612/file/fiche_big2010_thermophiles) (Consulté le 3/6/2019).

### B

**Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., 1990.** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. P: 34-428.

**Bragger J.M., Daniel R.M., Coolbear T., Morgan H.W., 1989.** very stable enzymes from extremely thermophilic archaeobacteria and eubacteria. *Appl. Microbiol. And Biotech.* 31:556-561.

**Barnabe., Sasseville R.D., Tyagi et J.R. Valero., 2003.** Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires premières ? VECTEUR environnement. vol.36.no.2,p.50-62.

**Bertoldo C., Antranikian G., 2001.** Amylolytic enzymes from hyperthermophiles. *Methods., Enzymol.,* 330:269-289.

### C

**Capdepuy M., Canellaa J., 1995.** La flore bactérienne des eaux thermales et minérales. *La Huille blanche.* No 2-3, p.70-72.

**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.

**Corliss J.B., Dymond J., Gordon L.I., Edmond J.M., Herzen von R.P., Ballard R.D., et al., 1979.** Submarine thermal springs on the galapagos rift. *Science* (New York, N. Y.), 203(4385), 1073–1083. doi:10.1126/science.203.4385.1073.

**D**

**Demirjian D.C., Shah P.C., Moris-varas F., 1999.** Screening for novel enzymes. Topics Curr. Chem., 200:1-29.

**Denis E., Ploy M.C., Martin C., Bingen E., Quentin R., 2011.** Bactériologie médicale Techniques usuelles. 2ème éd. Paris : Masson. 631p.

**E**

**Egorova K., Antranikian G.I., Garrett R.A., Klenk H.P., 2007.** Archaea: evolution, physiology, and molecular biology, Malden, USA, Blackwell Publishing, 295-321.

**F**

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

**Frazier W.C., 1926.** A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. J. Infect. Dis. 39:302-309.

**Forterre P., Elie C., Siuod M., Hamal A., 1989.** Studies on DNA polymerase and topoisomerases in archaebacteria. *Can J Microbiol* **35**, 228-233.

**G**

**Gregoire P., Fardeau M.L., Guasco S., Bouanane A., Michotey V., Bonin P., Dubourg K., Cambar J., Ollivier B., 2009.** Les micro-organismes de l'extrême. Press Therm Climat. Vol.146, p.49-61.

**Good fellow M., Jones A.L., 2009.** *Thermoactinomycetaceae* in Bergey's manual of systematic bacteriology 2nd Edition; Volume 3: The Firmicutes. Ed. De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B. P:144-461. Springer, New York.

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

### **H**

**Hobel C.F.V., 2004.** Access to biodiversity and new genes from thermophiles by special enrichment methods. Thesis, Faculty of Sciences, Reykjavik, Iceland.

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

**Hobel C.F.V., Marteinson V.T., Hauksdottir S., Fridjonsson Ó.H., Skirnisdottir S., Hreggvidsson G.Ó., Kristjansson J.K., 2004.** Use of low nutrient enrichments to access novel amylase genes in silent diversity of thermophiles. *W J Microbiol Biotech* **20**, 801-809.

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

**Harley J.P., Prescott L.M., 2002.** *Laboratory Exercises in Microbiology*. 5ème éd. Mc Graw Hill. 466p.

### **J**

**Joffin J.N., Leyral G., 2006.** *Microbiologie technique : dictionnaire de techniques*. 4ème éd. Espagne : Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine. 363 p.

### **K**

**Kirk O.T.V., Borchert et C.C., FUGLSANG., 2002.** Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*. vol.53.no.1,p.211-213.

### **L**

**Levisson M.J et al., 2009.** *Extremophiles* 13, 567-81.

**Logan N.A., Berge O., Bishop A.H., Busse H.J., De Vos P., Fritze D., Heyndrickx M., Kaampfer P., Salkinoja-Salonen M.S., Seldin L., Rabinovitch L., Ventosa A., 2009.** Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59:2114-2121.

**M**

**Minic Z., Serre V., Herve G., 2006.** Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *Comptes rendus biologiques*. Vol.329, p.527.

**Madigan M., Martinko J., 2007.** Brock Biologie des micro-organismes. Pearson Éducation, France.

**Madigan M.T., Martinko J.M ., Parker J., 2003.** Brock, Biology of Microorganisms, 10th ed. Prentice-Hall International, Upper Saddle River, New Jersey, USA.

**Madigan M., Martinko J., 2007.** Biologie des micro-organismes. 11<sup>ème</sup> éd. Paris : Pearson éducation France. 1047p.

**Mathis B.J et al., 2008.** Electricity generation by thermophilic microorganisms from marine sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78(1), p. 147-155 .

**P**

**Palud A et al., 2008.** *Mol Microbiol* 70, 746-61.

**Priest G.F., Fergus G., Good fellow M., Todd C., 1988.** A Numerical Classification of the genus *Bacillus*. *J. of general microbiol.*, 134:1847-1882.

**Q**

**Querellou J., Guezennec J., 2010.** Biotechnologie des extrémophiles. Editions Tech. Ing. BIO580; P: 1-13.

**Querellou J., 1999.** *La Recherche* 31, 34-5.

**R**

**Rawlings D.E., Johnson D.B., 2007 .***Microbiol* 153, 315-24.

**Rawlings D.E ., et Johnson D.B ., 2007.** The microbiology of biomining : development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiol.*, 153(2), p. 315-324 .

**S**

**Santos H., Lamosa P., Borges N., Gonçalves L.G., Pais T., Rodrigues M.V., 2011.** Organic compatible solutes of prokaryotes that thrive in hot environments: the importance of ionic compounds for thermostabilization in: *Extremophiles Handbook*. Ed. Horikoshi K. 4:511. Springer.

**Seurat L. G., et Frémy P., 1937.** Flore de l’afrique du nord page 313.

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

**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.

**Singleton P., 2005.** Bactériologie pour la médecine, la biologie, et les biotechnologies. 6ème éd. Paris : Dunod.542p.

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

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

**T**

**Tabak S et Bensoltane A., 2012.** L’activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophiles*, *Bifidobacterium bifidus* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. Laboratoire de microbiologie alimentaire et industrielle, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université d’Oran.9.

**Tholey A., Heinzle E., 2002.** Methods for Biocatalyst Screening. *Adv. in Biochem.Engin/Biotechn.*, 74:1-19.

**W**

**Williams YJ et al., 2009 .***Appl Environ Microbiol* 75,1860-6.

**Y**

**Yavuz E., Gunes H., Harsa S., Yenidunya A.F., 2004.** Identification of extracellular enzyme producing thermophilic bacilli from Balcova (Agamemnon) geothermal site by ITS rDNA RFLP. *J. of Appl. Microbiol.*, 97:810-817.



# ***Annexes***

**Annexe 01** Représentation des matériels de laboratoire.



**Autoclave**



**Etuve**



**Bain marie**



**Vortex**



**Agitateur**



**Balance**



**Bec bunsen**



**Tube à essai**



**pipette pasteur**



**Eprouvette**



**Boîte pétri**



**Fiole**



**Pince**



**Four pasteur**



**pissette**



**PH mètre**



**Spatule**



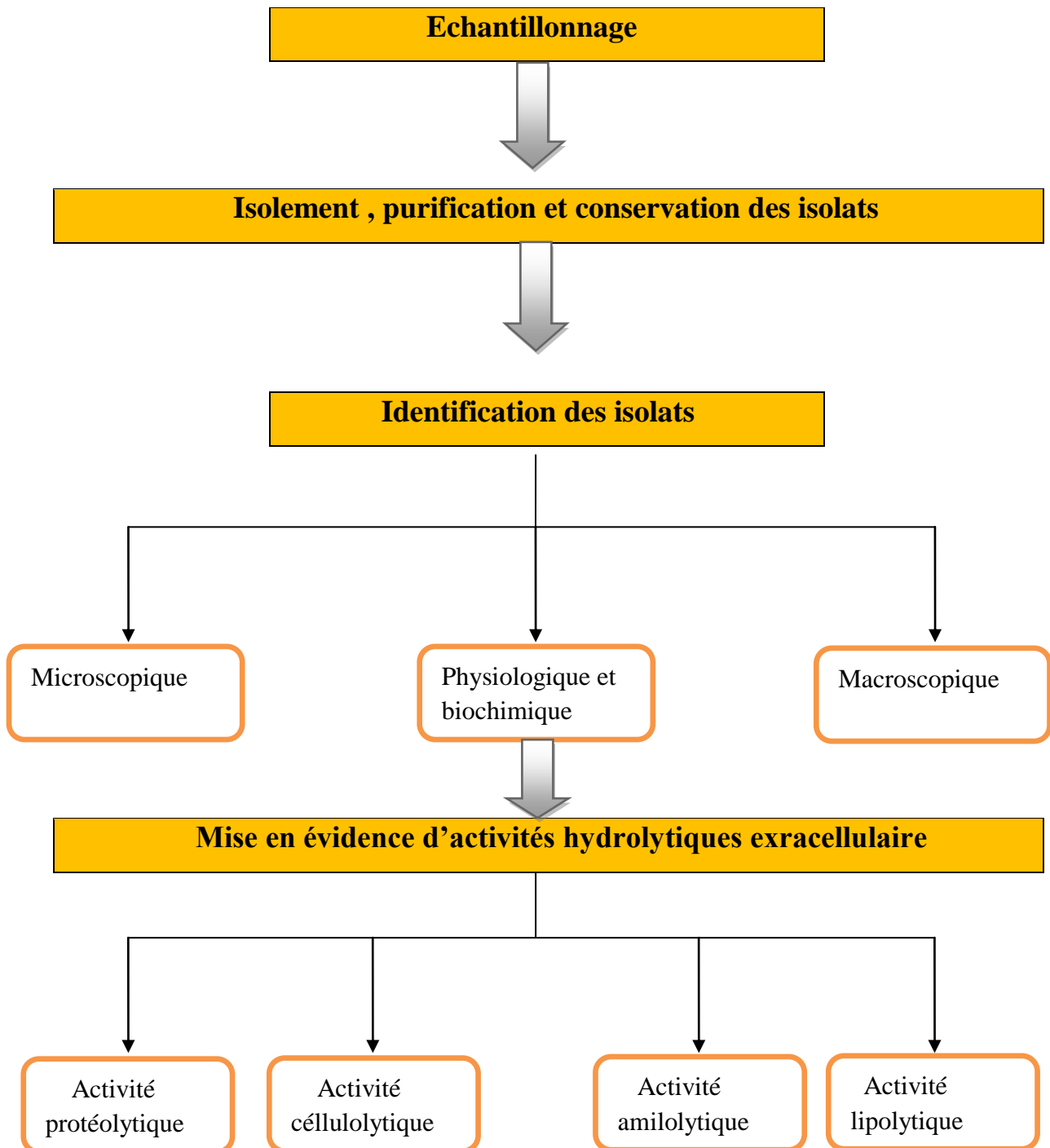
**Anse de platine**



**Flacon**

Annexe 02

➤ Protocole expérimentale



### **Annexe 03**

#### **➤ Milieux de culture liquides**

##### **• Bouillon enrichissement**

NACL.....	0.4g
Peptone.....	1.6g
Extrait de levure .....	0.8g
Eau de source stérile.....	200ml

##### **• Eau peptonée**

Eau peptonée.....	1.6g
Eau distillée.....	50ml

#### **➤ Milieux de culture solides**

##### **• Gélose nutritif (PH=6.8-7.4)**

NACL.....	2g
Agar.....	15g
Extrait de levure.....	4g
Peptone.....	8g
Eau de source stérile.....	1000ml

##### **• Milieu Mannitol-Mobilité (PH=7)**

Mannitol poudre.....	8.25g
Eau distillée.....	250ml

Stérilisation à température 120C° pondant15minute.

- **Milieu TSI(PH=7)**

TSI poudre.....21.65g

Eau distillée.....250ml

Stérilisation à température 120C° pondant15minute.

- **Milieu de base**

Agar.....3g

Peptone.....1.6g

Extrait de levure.....0.8g

Eau distillée.....200ml

Stérilisation à température 120C° pondant 15 minute.

- **Gélose à amidon**

Milieu de base.....50ml

Amidon .....0.5g

- **Milieu pour la mise en évidence de l'hydrolyse de tween 80**

Milieu de bases.....50ml

Tween 80.....1ml

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

Milieu de base.....50ml

Tween 20.....1ml

- **Gélose à caséine**

Milieu de base.....100ml

Caséine.....1g

- **Gélose à huile d'olive**

Milieu de base.....50ml

Huile d'olive.....1ml

- **Milieu de citrate de simmons (PH=6.6)**

Citrate de simmons .....14.6g

Eau distillée.....500ml

- **Gélose viande-foie(PH=7.4)**

Viande-foie.....17g

Eau distillée.....500ml