



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère De l'Enseignement Supérieur et De la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR -KHENCHELA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

FILIERE : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

OPTION : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Thème :

**Isolement et identification des bactéries
des sources thermales terrestres de l'Est
Algérien, cas de Hammam El Salhine**

Présenté par :

LAADJEL Warda

LAATAR Narimane

Jury de soutenance :

Président :	Mr	LARBAA Rabah	M.C.B	Université Abbès_Laghrour khenchela
Directrice :	Mme	BENREDJEM Lamia	M.A.A	Université Abbès_Laghrour khenchela
Examineur :	Mr	BOUSSAA Abdelhalim	M.A.A	Université Abbès_Laghrour khenchela

Promotion : Juin 2017

**Le travail a été réalisé au niveau du : laboratoire pédagogique de Microbiologie, Université ABBESS
LAGHROUR-Khenchela**

SOMMAIRE

<i>LISTE DES ABREVIATIONS</i>	<i>I</i>
<i>LISTE DES FIGURES</i>	<i>II</i>
<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	<i>III</i>
<i>INTRODUCTION</i>	<i>1</i>
Chapitre I :Généralités sur les eaux thermales	
I.1 Historique	<i>2</i>
I.2 Etymologie.....	<i>2</i>
I.3 Définition.....	<i>2</i>
I.4 Origine et fonctionnement des eaux thermales	<i>3</i>
I.4.1L'origine.....	<i>3</i>
I.4.2Les modes de fonctionnement	<i>3</i>
I.4.2.1Le mode de réchauffement des eaux	<i>3</i>
I.4.2.2Le moteur de la remonté en surface	<i>4</i>
I.5.La machine thermique	<i>5</i>
I.6Classification des eaux thermales	<i>6</i>
I.6.1Selon la température	<i>6</i>
I.6.2Selon la composition des minéraux	<i>6</i>
I.7Utilisation des eaux thermales	<i>7</i>
I.8. Présentation de la zone d'étude.....	<i>8</i>
I.8.2. Présentation de la wilaya de Khenchela	<i>8</i>
I.8.3. La station thermale Hammam El Salhine	<i>9</i>
I.8.4. Origine de la thermalité des eaux de Hammam El Salhine	<i>10</i>
I.8.5. Les Bénéfices Naturels des eaux thermales de Hammam El Salhine	<i>12</i>

Chapitre II :Les thermophiles

II.1. Introduction.	13
II.2. Les thermophiles et les hyperthermophiles	13
II.3. Classification des thermophiles	14
II.3.1 Classification des thermophiles sur la base de la température	14
II.3.2 Classification des thermophiles sur la base des enzymes	15
II.4.Niches écologique des thermophiles	15
II.4.1 biotopes naturels	15
II.4.2biotopes artificiels	15
II.5 L'adaptation thermophile	16
II.5.1 L'adaptation thermophile au niveau des protéines	16
II.5.2L'adaptation thermophile au niveau de la membrane	17
II.5.2L'adaptation thermophile au niveau génitique	17
II.6.Grandes voies métaboliques des procaryotes thermophiles	18
II.6.1 Autotrophie	18
II.6.2 Hétérotrophie	19
II.6.3 Oxygène.....	19
II.7. Les besoin nutritifs des bactéries thermophiles	20

Chapitre III :Applications des thermophiles

III.1.Introduction	21
III.2.Utilisation directe des thermophiles	21
III.2.1Agents de minéralisation	21
III.2.2Piles à combustible microbiennes	22
III.2.3Production d'hydrogène	22
III.3. Application indirectes	22
III.3.1 La bioconversion de l'amidon en sirop	23
III.3.2La bioconversion de cellulose en glucose.....	23

III.3.3Dégénération de la chitine	23
III.3.4Les lipases	24

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV.1. Echantillonnage.....	24
IV.1.1. Préparation du matériel.....	24
IV.1.2. Mesure des paramètres de l'eau	25
IV.1.2.1.Mesure de la température	25
IV.1.2.2.Mesure de pH	25
IV.2. Isolement et identification des bactéries	26
IV.2.1. Isolement et purification	26
IV.2.2. Aspects macroscopique et microscopique des souches étudiées	26
IV.2.3. Caractérisation biochimique	27
IV.2.3.1. Test de catalase.....	27
IV.2.3.2. Utilisation de substrats carbonés	27
IV.2.3.3. Réaction au rouge de méthyle (RM)	27
IV.2.3.4. Recherche de l'uréase	27
IV.3. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires	27
IV.3.1. Amylase	28
IV.3.2. Protéases	28
IV.3.2.1.Hydrolyse de la caséine	28
IV.3.2.1.Hydrolyse de la gélatine.....	28
IV.3.3. Activités lipolytiques (hydrolyse des Tween 20 et 80)	28
IV.4. Résistance des isolats aux températures élevées.....	29

Chapitre V :Résultats et discussion

V.1. Analyse physico-chimique des isolats	30
V.2. Isolement et caractérisation des isolats	30
V.2.1. Aspects macroscopique et microscopique des souches étudiées.....	30

V.2.2. Résultats de la caractérisation biochimique	33
V.2.2.1. Test de la catalase	33
V.2.2.2. Réaction au rouge de méthyle (RM)	33
V.2.2.3. Recherche de l'uréase	33
V.2.2.4. Utilisation des substrats carbonés	35
V.3. Résultats d'identification des souches	38
V.3. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires des souches obtenues ..	38
V.4. Stabilité thermique.....	43
V.5. Discussion	44
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	46
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	47
RESUMES	
ANNEXES	

Remerciements

Nous remercions premièrement ALLAH unique le Tout Puissant de nous avoir donné patience, santé et volonté tout au long de nos études.

Nous tenons vivement à remercier notre promotrice Mme BENREDJEM Lamia, Maître-assistante à l'Université de Khenchela pour ses conseils qui nous ont été précieux ainsi que toutes les suggestions et remarques qu'elle a formulées tout au long de ce travail.

Nous remercions sincèrement Mr. LARBAA Rabah Maître de conférences à l'Université de Khenchela, d'avoir accepté de présider le jury de ce modeste travail.

Nos vifs remerciements vont également à Mr. BOUSSAA Abdelhalim Maître-assistant à l'Université de Khenchela, d'avoir accepté d'examiner ce travail

Nous remercions également toutes les personnes qui ont collaboré à la réalisation de ce travail en particulier les membres du Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Khenchela.

Nous remercions également :

À tous nos enseignants du Département Biologie Moléculaire et Cellulaire qui ont contribué à notre formation.



Dédicaces

Rien n'est aussi beau à offrir que le fruit d'un labeur qu'on dédie du Fond du cœur à ceux qu'on aime et qu'on remercie en exprimant la Gratitude et la reconnaissance durant toute notre existence.

Je dédie ce modeste travail :

- *Mon très cher père, en connaissance de tous les sacrifices, les efforts, l'amour et la gentillesse qu'il ma toujours apporté.*

- *Ma mère pour sa tendresse, sa patience et ses encouragements.*

Je les remercie pour leur confiance et « que ALLAH leur accordent une très longue vie ».

- *Mes chers frères : Yousef, Nabil, Hichem, Bilal*

- *Ma chère sœur, et mes belles sœurs*

- *Mes chères cousines : Habiba, Faiza, Nora, Soumia, Khaoula*

- *Mon cher binôme Narimane*

- *Mes chères amies*

- *Toute la promotion de microbiologie 2017.*

- *Tous mes professeurs.*

- *A toute personne qui me connaisse.*

WARDA



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

- *À mon profond amour ma mère qui m'a donné à la vie qui s'est sacrifié pour mon bonheur et ma réussite.*
- *A mon père, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, qui a veillé à me donner l'aide.*
- *D'abord à ceux qui ont sacrifié beaucoup pour moi et qui m'ont*

Donnée tout pour que je réussisse : mon marié et l'étoile de ma vie : « Abd El Hakim ».

- *A mes chères sœurs : Imène, Abla, Kamilia pour leurs précieux soutient et aide morale et affective durant toutes mes années d'études.*
- *A mes chers frères : Nacer El dine, Kaddour, Halim.*
 - *A ma belle-mère et mon beau-père.*
 - *A ma cher binôme Warda. et mes chers amies.*
 - *A toute ma famille sans exception.*
 - *A mes collègues d'études.*
 - *A toutes la promotion : Microbiologie*

NARIMANE

Résumé

Ce travail a permis de mettre en évidence la population bactérienne thermophile d'une source thermale de l'Est Algérien, Hammam El Salhine -Khenchela-, qui sont des organismes unicellulaires capables de vivre dans des températures comprises entre 45°C et 70 °.

L'isolement et la purification de ces microorganismes sur des milieux spécifique à des températures de 55°C ont permis la détermination de 11 souches appartient à sept genres : *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Caldimonas*, *Laceyella*, *Caldibacillus*, *Kroppenstedtia* et *Thermobacillus*. Parmi ces dernières, plus de 70% ont montré des activités biochimiques hydrolytiques extracellulaires ; amylolytique, protéolytiques et lipolytiques. Ces souches ont également montré une bonne tolérance des températures élevées allant jusqu'à 70°C ce qui ouvre des perspectives pour des applications dans le domaine industriel.

Mots clés : Bactéries thermophiles, Isolement, Identification, source thermale, Hammam El-Salhine, Activités hydrolytiques

Abstract

This work demonstrated the thermophilic bacterial population living in a thermal spring in the East of Algeria, exactly in Hammam El Salhine -Khenchela-which are unicellular organisms able to live between 45 ° C and 70 ° C.

The isolation and purification of these microorganisms in specific media at 55 ° C has allowed the determination of 11 strains that belong to seven genera: *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Caldimonas*, *Laceyella*, *Caldibacillus*, *Kroppenstedtia* and *Thermobacillus*. More than 70% of them showed extracellular activities hydrolytic; amylolytic, proteolytic and lipolytic. These strains have also showed good tolerance to high temperatures up to 70 ° C, which opens prospects for applications in the industrial field.

Key words: Thermophilic bacteria, Isolation, Purification, Thermal spring, Hammam El-Salhine, Hydrolytic activities.

ملخص

يمكننا هذا العمل من تسليط الضوء على المجتمع البكتيري الاليف للحرارة لمنبع حراري حمام الصالحين بالشرق الجزائري -خنشلة-. وهي كائنات مجهرية وحيدة الخلية قادرة على العيش في درجات حرارة تتراوح بين 45 و70 درجة مئوية.

عزل وتنقية هذه الكائنات المجهرية في أوساط محددة تحت درجة حرارة 55 درجة مئوية يسمح بتحديد 11 سلالة ينتمون إلى سبع أجناس: *Anoxybacillus*، *Geobacillus*، *Caldimonas*، *Laceyella*، *Caldibacillus*، *Thermobacillus* و *Kroppenstedtia*. من بين هذه الأخيرة، أكثر من 70% أظهرت أنشطة بيوكيميائية حلمية خارج الخلية؛ محلل النشا، محلل بروتين و محلل الشحميات. وأظهرت هذه السلالات أيضا تحمّل لدرجات الحرارة العالية التي تصل إلى 70 درجة مئوية مما يفتح آفاقا للتطبيقات في المجال الصناعي.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا أليف للحرارة، عزل، تحديد، منبع حراري، حمام الصالحين، الأنشطة الحلمية

LISTE DES ABREVIATIONS

°C : Degré Celsius.

A : Adénine.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARN : Acide RiboNucléique.

ARN_r : Acide ribonucléique ribosomal.

Bacillus sp : *Bacillus species*.

C : Cytosine.

E. coli : *Escherichia coli*.

EC : Enzyme Commission.

G : Guanine.

g/l : gramme/litre.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H₂S : Oxydation du soufre.

N₂ : Diazote.

NH₄Cl : Chlorure d'ammonium.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

T : Thymine.

T max : Température maximal.

U : Uracile.

µm: Micro- mètre.

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Modèle de circulation des fluides au sein d'un système hydrothermale.	5
Figure 02 : Situation géographique de la wilaya de Khenchela.....	9
Figure 03 : Représentation du point d'échantillonnage de Hammam El Salhine Khenchela.....	10
Figure 04 : Carte du gradient géothermique de l'Algérie du Nord.....	11
Figure 05 : limites supérieures de température pour le métabolisme énergétique.....	19
Figure 06 : Flacon rincé à l'eau de l'échantillon.....	25
Figure 07 : Multi paramètre (Consort C535)	25
Figure 08 : Mesure de pH et la température.	26
Figure 09 : Aspects macroscopiques des souches isolées cultivées sur les milieux 1, 2, 3 ,4 et 5.....	32
Figure 10 : Résultat de teste d'uréase sur les 11 souches cultivées	34
Figure 11 : Aspects macroscopiques des souches qui utilisent le galactose comme substrat carboné.....	36
Figure 12 : Aspects macroscopiques des souches qui utilisent le fructose comme substrat carboné.	36
Figure 13 : Aspects macroscopiques des souches qui utilisent saccharose comme substrat carboné	36
Figure 14 : Aspects macroscopiques des souches qui utilisent le glucose comme substrat carboné.....	36
Figure 15 : Aspects macroscopiques des souches qui utilisent le maltose comme substrat carboné.....	37
Figure 16 : Aspects macroscopiques des souches qui utilisent le lactose comme substrat carboné.....	37
Figure 17 : Aspects macroscopiques des souches qui d'hydrolysent l'amylase	39

Figure 18 : Aspects macroscopiques des souches qui d'hydrolysent la gélatine.....**40**

Figure 19 : Aspects macroscopiques des souches qui d'hydrolysent la caséine.....**41**

Figure 20 : Aspects macroscopiques des colonies des souches qui d'hydrolysent le
tween 80..**42**

Figure 21 : Aspects macroscopiques des colonies des souches qui d'hydrolysent le
tween 20.....**43**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Tableau illustrant des limites et optimums représentatifs des bactéries thermophiles.....	14
Tableau 02 : Tableau illustrant la classification des thermophiles sur la base d'activité enzymatiques.....	15
Tableau 03 : caractéristiques macroscopique et microscopique des isolats par milieu de culture utilisé.	31
Tableau 04 : Caractérisation biochimique des isolats.	33
Tableau 05 : Utilisation des substances organiques.....	35
Tableau 06 : Résultats d'identification des 11 souches étudiées	38
Tableau 07 : Activités hydrolytiques des souches étudiées.....	39

Introduction

Les eaux thermales sont des eaux minérales naturelles provenant de nappes souterraines, auxquelles sont attribuées des propriétés thérapeutiques en raison de leur composition chimique ou de leur température. Elles sont aussi considérées comme un milieu favorable pour le développement des extrêmophiles, qui sont des microorganismes qui se développent de manière optimale dans des conditions de milieux mortelles pour la quasi-totalité des autres espèces grâce à leurs stratégies adaptatives très variées. Ils présentent de ce fait un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans des conditions extrêmes (**Zemour, 2015**).

Dans notre étude nous nous intéressons à des bactéries thermophiles isolées à partir des sources thermales de Hammam El-Salhine, Wilaya de Khenchela, et nous présentons dans ce mémoire les chapitres suivants :

- le premier est une partie descriptive des sources thermales et leurs origines ;
- le deuxième comporte les propriétés et les caractéristiques des thermophiles ;
- le troisième est basé sur intérêt scientifique de ces microorganismes principalement en ce qui concerne leur potentiel biotechnologique et aussi les enzymes thermostables qu'ils produisent telles que les amylases et les protéases ;
- alors que le dernier chapitre représente la partie pratique avec les résultats obtenus de l'identification et le screening de quelques activités hydrolytiques extracellulaires des souches isolées à partir de cet écosystème.

I. 1. Historique

Les traces retrouvées dans les stations thermales remontent à l'époque romaine. En effet les romains accordaient une importance très particulière aux sources thermales, très souvent ils construisirent leurs sites autour de ces sources, comme c'est le cas pour les sites suivants : (Hammam Righa) ; (Hammam El Salhine) ; (Hammam Bouhanifia) ; (Hammam Meskoutine) (**Ouali, 2008**).

Les sources thermales furent aussi bien exploitées par les arabes, en effet très souvent des sources portent le nom d'un marabout qui a vécu dans la région.

Les Turcs aussi très amateurs des bains chauds construisirent dans les villes plusieurs bains avec des installations permettant le stockage de l'eau de source. Pendant l'époque coloniale, les français construisirent des hôpitaux thermaux autour des sources pour y soigner les blessés et convalescents. Aujourd'hui comme dans le passé les stations thermales sont très sollicitées par les algériens pour divers traitements d'ordre rhumatologique, dermatologique et psychiatrique (**Ouali, 2008**).

I. 2. Etymologie

L'adjectif «thermal» est dérivé du nom «thermes». Les origines de «thermes» sont issues du latin «thermae», et du grec «thermos», signifiant chaud. Ce mot apparaît en 1625 dans la langue française (**Castany et Margat, 1977**). Et la notion des «eaux thermales» est quant à elle attestée en 1735 par **Woodward**.

I. 3. Définition

Une eau thermale n'a pas de définition officielle, mais l'étymologie lui attribue une (température supérieure à celle des eaux phréatiques de la région) ; pour certains, c'est une eau utilisée dans un établissement thermal. Pour d'autres, c'est une eau de température à l'émergence supérieure de 6°C à la température moyenne annuelle locale, voir une eau supérieure à 35° C.

Les eaux thermales sont des eaux minérales naturelles provenant de nappes souterraines, auxquelles sont attribuées des propriétés thérapeutiques en raison de leur composition chimique ou de leur température. Au sens strict, une eau thermale est une eau chaude mais les expressions eau thermale et eau minérale sont le plus souvent employées, de façon indifférenciée (**Zemour, 2015**).

I. 4. Origine et fonctionnement des eaux thermales

I. 4.1. L'origine

Une eau minérale naturelle peut avoir trois origines : superficielle, profonde, ou mixte.

Les eaux minérales naturelles d'origine superficielle sont communément appelées eau va doses (météoriques) ou géothermales. Ce sont des eaux de précipitation, froides infiltrées à de grandes profondeurs de l'écorce terrestre (gravité, phénomènes de capillarité), le long de fissures ou de couches de terrains imperméables. L'émergence de ces eaux s'effectue aux niveaux d'accidents de l'écorce terrestre. Ces eaux vont pénétrer par des fissures à partir de terrains poreux, ruisseler sur des zones souterraines puis enfin remonter par griffons : on parle de cycle hydrogéologique. (**Auby, 1994**).

Elles émergent essentiellement dans des régions volcaniques du fait de leur relation plus ou moins directe avec les zones magmatiques. Ces eaux sont piégées lors du refroidissement de l'écorce terrestre et par conséquent n'ont jamais participé à un cycle hydrogéologique

La majorité des eaux minérales ont une origine mixte : elles résultent d'un mélange, dans des proportions variables lors de leur remontée, entre des eaux juvéniles d'origine profonde et des eaux superficielles (**Auby, 1994**).

I. 4.2. Les modes de fonctionnement

Le fonctionnement de tous les systèmes thermaux est marqué par 3 étapes :

- un transfert des eaux météoriques vers la profondeur ;
- un réchauffement des eaux ;
- une remontée rapide à la surface.

Blavoux, 1995 considère que les eaux thermales sont majoritairement alimentées par les eaux météoriques et l'origine juvénile proposée par **Blanchard, 1946** peut donc être rejetée. Les sources thermales se différencient alors en fonction de deux critères : le mode de réchauffement des eaux et le moteur de remontée des eaux vers la surface (**Fig. 1**)

I. 4.2.1. Le mode de réchauffement des eaux

A partir d'environ 30 à 50 m de profondeur, la température augmente sous l'effet du flux géothermique interne. Le gradient géothermique dépend de la valeur du flux terrestre et de la conductivité des roches (**Vuataz, 1982**).

Le gradient géothermique est en moyenne de $1^{\circ}\text{C}/33\text{m}$ (ou $0.03^{\circ}\text{C}/\text{m}$) et va être modifié par différents facteurs que l'on peut dissocier en facteurs externes et internes. Les facteurs externes ne modifient pas la valeur du flux géothermique et regroupent : la nature des roches encaissantes, la topographie, l'érosion, les variations paléo-climatiques et les circulations d'eau. Les facteurs internes vont modifier la valeur du flux géothermique, les phénomènes responsables de cette modification sont : le magmatisme actif ou récemment (cénozoïque), la tectonique (menant à un amincissement de la croûte) et le métabolisme profond.

I. 4.2.2. Le moteur de la remontée en surface

La remontée rapide vers la surface se fera par l'intermédiaire de zones de forte perméabilité telles que des failles, diaclases, filons ou contacts sédimentaires. Le moteur de cette remontée peut être de trois types :

- la pression hydrostatique : une différence d'altitude entre la zone d'infiltration et la zone d'émergence va créer une différence de charge suffisante pour faire remonter les eaux vers la surface. On parle du système en U ou de siphon.

- la présence de gaz dissous : les eaux thermales peuvent contenir des gaz dissous. Ils proviennent soit d'émissions depuis les chambres magmatiques (CO_2 , N_2 , H_2) soit de phénomènes superficiels (comme les sulfates par exemple) libérant de l' H_2S ou du CO_2 . La présence de gaz dissous va accélérer la remontée vers la surface. En effet, lorsque la pression diminue au moment de la remontée, les gaz dissous sont libérés sous forme libre et ceci provoque une diminution de densité du fluide alors constitué de deux phases : liquide et gazeuse.

- La différence de densité de l'eau chaude : la densité de l'eau diminue lorsque la température augmente. Ceci favorise aussi la remontée des eaux vers la surface mais constitue rarement une condition suffisante.

Pour chaque source étudiée, il convient de définir ces critères. Cependant, chaque source thermique est particulière et peut présenter un ou plusieurs modes de réchauffement ainsi qu'un ou plusieurs moteurs de remontée. (**Vuataz, 1982**).

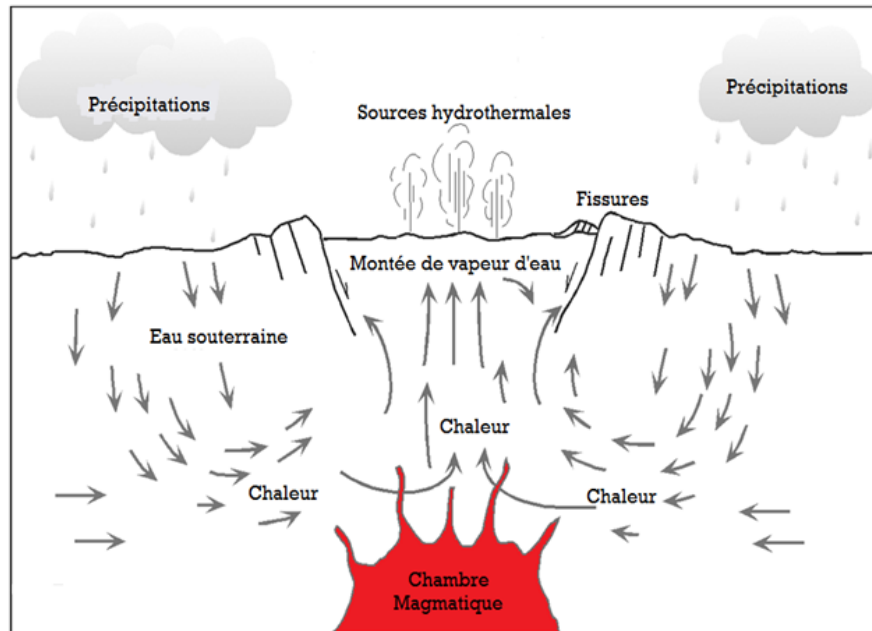


Figure 01 : Modèle de circulation des fluides au sein d'un système hydrothermal.
(Caminiti, 2012)

I. 5. La machine thermique

La "machine thermique" qui est à l'origine de la thermalité fonctionne, schématiquement, de la façon suivante : la densité de l'eau diminuant quand sa température augmente, l'eau réchauffée dans les profondeurs de la terre tend à remonter vers la surface, sa circulation étant facilitée par le fait que l'élévation de température diminue sa viscosité. C'est l'effet de "thermosiphon" : l'eau froide s'enfonce, puis se réchauffe, puis remonte. Sa circulation en profondeur draine une chaleur accumulée depuis des centaines, voire des millions d'années. Cette chaleur provient pour une grande part des 15 à 20 premiers kilomètres de la croûte terrestre, et, pour une part plus modeste, du manteau, encore plus profond. L'effet thermosiphon explique les différentes compositions des eaux. C'est en effet au cours de leur "trajet" qu'elles se chargent des éléments qui les constituent. Les eaux les plus profondes, dites plutoniennes, sont les plus anciennes (on estime leur âge en millions d'années) et généralement les plus chaudes. Les eaux superficielles, dites neptuniennes, sont plus fraîches et plus récentes (Pierre, 2001).

I. 6. Classification des eaux thermales

I. 6.1. Selon la température

Nous retiendrons avec **Verdeil, 1986** et **Issaadi, 1992** la classification des eaux thermales selon leur température d'émergence :

- Eaux hypothermales : ce sont des eaux dont la température à l'émergence est inférieure à celle de la partie supérieure de la zone d'homothermie ou à la température moyenne interannuelle du lieu d'émergence plus 4°C.
- Eaux métriothermales : ce sont des eaux dont la température à l'émergence est inférieure à 30°C mais supérieure à celle des eaux hypo thermales.
- Eaux méso thermales : ce sont des eaux dont la température à l'émergence est entre 30°C et 50°C.
- Eaux hyperthermales : ce sont des eaux dont la température à l'émergence est supérieure à 50°C et inférieure à 100°C

I. 6.2. Selon la composition des minéraux

Cette classification concerne les eaux fortement minéralisées et distingue 5 grandes familles selon **Pierre, 2001** :

I. 6.2.1. Les eaux chlorurées sodiques

- Chlorurées sodiques fortes : froides, neptuniennes, elles contiennent une grande concentration en éléments secondaires, tel le magnésium.
- Chlorurées sodiques faibles.
- Carbogazeuses

I. 6.2.2.-Les eaux bicarbonatées (ou carboniques)

- Bicarbonatées sodiques.
- Bicarbonatées calciques et sodico-calciques.
- Bicarbonatées mixtes chlorurées, polymétalliques.

I. 6.2.3. Les eaux sulfatées

- Sulfatées calciques à faible minéralisation.
- Sulfatées mixtes, chlorurées et bicarbonatées.

- Sulfatées sodico-magnésiennes fortes.

I. 6.2.4. Les eaux sulfurées

- Sulfurées sodiques.
- Sulfurées mixtes sodico-calciques et sodico-chlorurées.
- Sulfurées calciques, hyposulfitées

I. 6.2.5. Les eaux minéralisées oligométalliques

- Ferrugineuses
- Cuivreuses.
- Arsenicales

I. 7. Utilisation des eaux thermales

➤ Thermalisme et Tourisme de Santé

Le thermalisme est l'utilisation, à des fins thérapeutiques, d'eaux minérales naturelles à l'émergence de la source. C'est une médecine naturelle par excellence faisant appel aux agents contenus dans les eaux, les boues et les gaz”.

Le thermalisme en Algérie n'est pas un phénomène de l'époque contemporaine. L'usage des eaux thermales dans un but thérapeutique remonte à la nuit des temps.

Déjà, les Romains avaient su “domestiquer” les eaux qui jaillissaient du sous-sol, de manière certes archaïque, car dépourvue de base scientifique. Il reste cependant qu'ils furent les premiers à nous donner la preuve historique de leurs vertus curatives.

L'histoire nous apprend en effet que les Romains en peuplant les régions d'Afrique du Nord, découvrirent des norias de griffons (ou points d'émergence d'une source). C'est ainsi qu'ils s'établirent dans l'environnement immédiat des thermes et y bâtirent des “tépidariums” (salles de thermes à température tiède) ainsi que des “caldariums” (salles de bains chauds et de vapeurs thermales). (**Berkani , 2011**).

Parmi les différents produits touristiques que possède l'Algérie, le thermalisme ou “tourisme de santé”, constitue une priorité de développement du secteur compte tenu de l'existence d'un potentiel thermal important à valoriser, ainsi que d'une demande multi forme de la population en quête de villégiature, de repos, de détente, de soins, de remise en forme et de bien-être. C'est précisément dans ce cadre que le Ministère en charge du

Tourisme envisage à juste titre d'engager une vaste opération de mise à niveau et de modernisation de l'ensemble des stations thermales.

C'est ainsi que, parmi le patrimoine thermo minéral algérien qui se compose de plus de 200 sources parmi lesquelles la station thermale de Hammam El Salhine -khenchela- (**Berkani , 2011**).

I.8. Présentation de la zone d'étude

I.8.1. Cadre d'étude

Pour la réalisation de notre étude, nous avons choisi un site à travers la wilaya de Khenchela.

I.8.2. Présentation de la wilaya de Khenchela

La wilaya de Khenchela est située à l'Est de l'Algérie, au contrefort des monts des Aurès, dans l'aire géographique comprise entre **6° 32'** et **7° 34'** de longitude Est et entre **35° 7'** et **35° 38'** de latitude Nord. Elle est limitée géographiquement au :

- Nord : par la wilaya d'Oum el Bouaghi.
- Sud : par la wilaya d'El Oued.
- Est : par la wilaya de Tébessa.
- Ouest : par la wilaya de Batna.
- Sud- Ouest : par la wilaya de Biskra. (fig.02.) (**Monographie Khenchela, direction de tourisme, 2007**)

La superficie de la wilaya est estimée de **9715.6 Km²** composée de **8** daïra et **21** communes.

La wilaya de Khenchela dispose de **40** sources, dont **03** Source thermales à Hammam El Salhine.

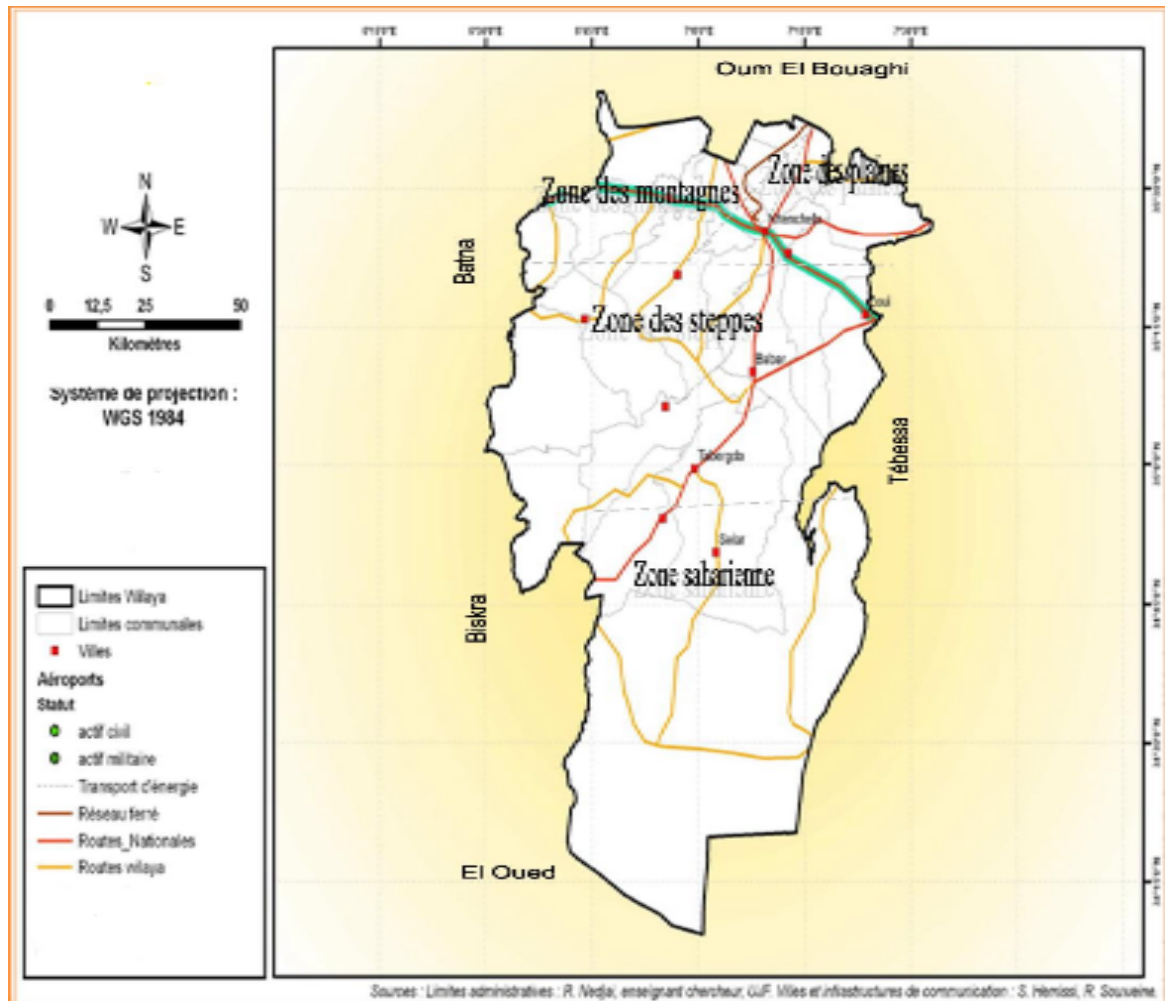


Figure 02 : Situation géographique de la wilaya de Khenchela (Badrweb, 2011)

I.8.3. La station thermale Hammam El Salhine

La station thermale Hammam El Salhine (Khenchela) est située dans la commune d'El Hamma, à **7 km** au Nord-Ouest de chef-lieu de la wilaya de Khenchela (fig.03) dans une dépression montagneuse sur une altitude de 1063 m aux coordonnées suivantes :

* **7°05'00.85" Est**

* **35°26'32.78" Nord**

La station est facilement accessible grâce à deux chemins de la wilaya. Trois sources thermales (Griffons) alimentent hammam El Salhine avec différentes températures à l'émergence dont la plus élevée est de **70° C**.

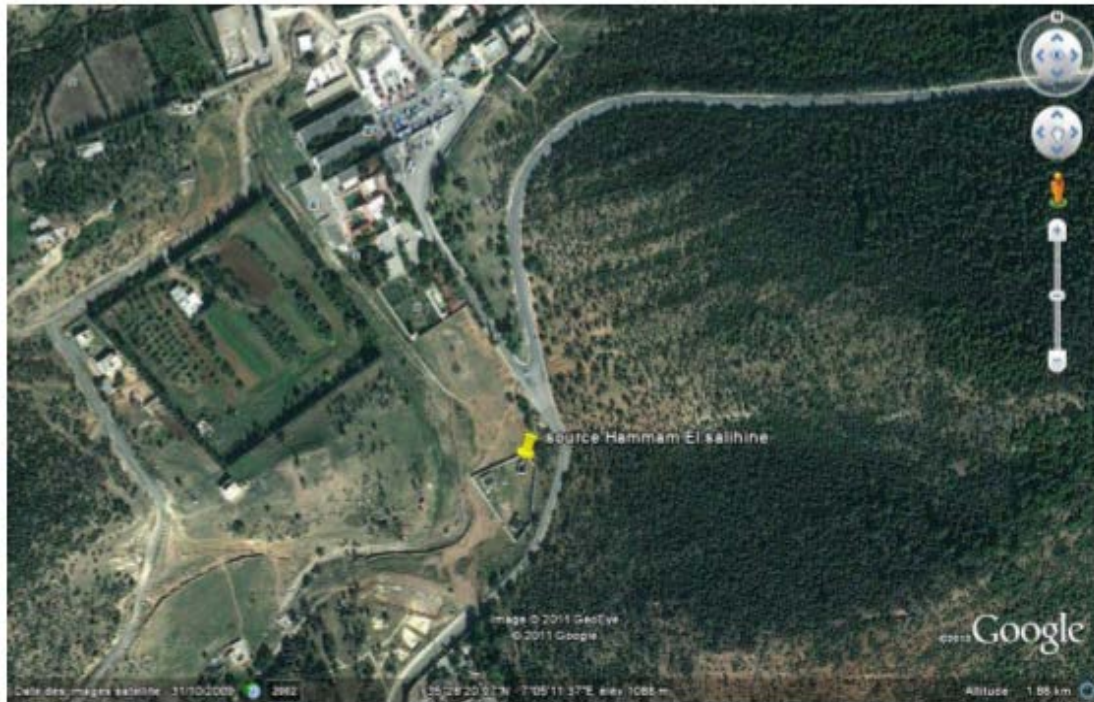


Figure 03 : Représentation du point d'échantillonnage de Hammam El Salhine Khenchela.
(Google earth, Juin 2017)

I.8.4. Origine de la thermalité des eaux de Hammam El Salhine

On sait depuis longtemps, grâce aux exploitations minières que la température augmente avec la profondeur. Une température élevée est donc, à priori, un indice d'origine profonde.

On explique la relation entre la température et la profondeur par le terme de gradient géothermique (**fig. 04**). Par définition, le gradient géothermique (degré géothermique) est la profondeur de pénétration dans le sol, exprimée en mètre, nécessaire pour que la température augmente de 1°C . Variable suivant les endroits et la profondeur ; sa valeur est moyenne de **30 à 35 m**. (**Abouba et Ghedir 2010**).

Le gradient géothermique est fonction du flux de chaleur terrestre et de la conductibilité calorifique des roches. Dans une région considérée ; une valeur plus au moins élevée du gradient géothermique traduira l'intensité de ce flux de chaleur.

- Les activités tectoniques récentes, seraient aussi à l'origine d'anomalies positives, dans ce cas un gradient géothermique particulièrement élevé peut être observé.

- Les mouvements orogéniques peuvent produire de l'énergie calorifique liée aux déformations mécaniques des roches et surtout aux frottements qui s'effectuent le long de grands accidents et dislocation.
- Enfin les réactions physico chimiques exothermiques résultant de la réduction des sulfates, de l'oxydation de sulfures de fer et de la transformation de l'anhydrite en gypse et la désintégration des minéraux radioactifs peuvent aussi engendrer une élévation considérable de la température d'eaux.

Ces différentes propriétés ne s'excluent pas mutuellement mais certaines apparaissent comme secondaires et ne pouvant provoquer des échauffements importants : c'est le cas de la chaleur dégagée par la désintégration d'éléments radioactifs (Le Maréchal).

La chaleur dégagée par les réactions chimiques exothermiques est généralement considérée comme négligeables. En fait, **Abouba et Ghedir 2010** ont montré qu'elle pouvait jouer un rôle important.

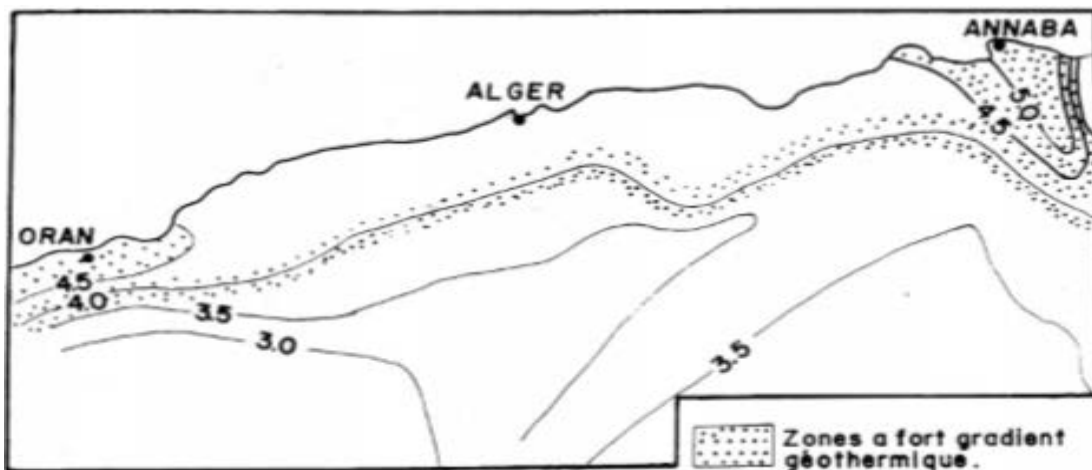


Figure 04 : Carte du gradient géothermique de l'Algérie du Nord (d'après Kazi Tani, 1974).

I.8.5. Les Bénéfices Naturels des eaux thermales de Hammam El Salhine

La température de ses eaux avoisine les 70°C degrés et sa composition chimique lui confère des propriétés thérapeutiques indiquées pour :

- la rhumatologie et les séquelles de traumatismes ;
- les voies respiratoires et la sphère ORL ;
- les voies digestives et les maladies métaboliques ;
- la dermatologie ;
- la neurologie ;
- les maladies cardio-artérielles.
- les maladies osseuses
- approche de coffre (**Guide touristique de la wilaya de Khenchela 2007**).

II.1. Introduction

Dans de nombreux milieux aquatiques règnent des conditions extrêmes de température, de pression, de salinité, de pH, ou de concentrations en éléments nutritifs. Dans ces milieux vivent néanmoins des microorganismes, dits extrêmophiles, qui diffèrent des types classiques par leurs structures et leur physiologie. Des bactéries thermophiles extrêmes, capables de se multiplier jusque vers 100 °C, ont été découvertes dans les sources thermales, les geysers et les zones de volcanisme sous-marin. La composition particulière de leurs lipides permet de maintenir l'intégrité de leurs membranes à haute température et leurs protéines, très stables, ne sont pas dénaturées par la chaleur. La plupart appartiennent au groupe remarquable des Archaeobactéries, souvent présentes dans des habitats extrêmes (Gounot, 1997).

II.2. Les thermophiles et les hyperthermophiles

Un thermophile est un organisme unicellulaire (bactérie, protiste) ou, plus rarement, pluricellulaire (algue, champignon) capable de vivre à des températures comprises entre 45°C et 70 °C, mortelles pour la plupart des êtres vivants (Wilhelm, 1998).

Les hyperthermophiles sont une classe des thermophiles qui ne peuvent vivre qu'au-dessus de 60 °C. Ce sont exclusivement des bactéries et des archéobactéries. (Segueni *et al.*, 2007). Le record est actuellement détenu par une archéobactérie, baptisée Strain 121°C, découverte dans une source hydrothermale du Pacifique par 2 400 m de profondeur et qui se multiplie encore à 121 °C. Elle résiste même sans dommage à des températures de 130 °C (Vittorio, 2000).

Les plus connues des bactéries thermophiles sont *Bacillus stearothermophilus* (T max 60°C), une thermophile modérée Gram positif proche de *Bacillus subtilis*, *Thermus aquaticus* (T max 70°C) et *Thermus thermophilus* (T max 80°C). Les bactéries du genre *Thermus* appartiennent au même groupe bactérien que la bactérie radio-résistante *Deinococcus radiodurans* (ce sont des bactéries Gram négatives très éloignées d'*E. coli*). Ces thermophiles bactériens sont tous aérobies et hétérotrophes (Jean, 1991).

Les hyperthermophiles bactériens appartiennent aux genres *Thermotoga* et *Aquifex*. Les plus connus sont *Thermotoga maritima* (T max 90°C) et *Aquifex*

xpyrophilus (T max 95°C). Ces hyperthermophiles branchent en premier dans l'arbre des ARNr 16S, ce sont des bactéries anaérobies (*Thermotoga*) ou microaérobies (*Aquifex*), elles sont hétérotrophes (*Thermotoga*) ou chemio-litoautotrophes (*Aquifex*) (André, 2003).

II.3. Classification des Thermophiles

II.3.1. Classification des Thermophiles sur la base de la température pour la croissance

La température est une variable importante de chaque écosystème. Pour cette raison, la classification des organismes vivants sur la base de leur température optimale de croissance est considérée comme un aspect fondamental de la taxonomie microbiologique. Le tableau 01 représente une classification des de ces quatre catégories des bactéries thermophiles.

Tableau 01 : Tableau illustrant des limites et optimums représentatifs des bactéries thermophiles (Lansing *et al.*, 1994).

Thermophiles	La température pour les croissances les plus élevées	Typique des espèces
Mésophiles	<55°C	<i>E. coli</i>
Thermophile modérée	≥55°C	<i>Bacillus strearothermophilus</i> <i>thermophiles Compost</i>
Extrême thermophile	≥75°C	<i>Thermus thermophilus</i> <i>Thermophiles Hot Spa</i>
Hyperthermophile	≥90°C	<i>Pyrococcus furiosus</i> <i>Thermophiles</i> <i>Hydrothermaux</i>

II.3.2. Classification des thermophiles sur la base des enzymes

Les bactéries thermophiles sont regroupées en trois catégories selon la base d'activité enzymatiques thermophiles modérés (45-65°C), thermophiles (65-85°C), et hyperthermophiles (>85°C) (**Tab. 02**).

Tableau 02 : Tableau illustrant la classification des thermophiles sur la base d'activité enzymatiques (**Segueni et al., 2007**).

Habitat	Exemples d'activités enzymatiques	Quelques applications
<ul style="list-style-type: none"> - Thermophiles modérés (45-65°C) - Thermophiles (65-85°C) - Hyperthermophiles (>85°C) 	<ul style="list-style-type: none"> - Amylases - Xylanases - Protéases - DNA-polymérase 	<ul style="list-style-type: none"> - Production de glucose et de fructose - Blanchissement du papier - Industrie des lessives - Génie génétique

II.4. Niches écologiques des thermophiles

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

II.4.1. Biotopes naturels

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

II.4.2. Biotopes artificiels

Les thermophiles habitent également les systèmes thermiques artificiels tels que les circuits d'alimentation et les réservoirs d'eau chaude, les centrales nucléaires,

les usines géothermiques, les puits et forages de pétrole, le compost et les bioréacteurs (Ferrera et Reysenbach , 2007).

II.5. L'adaptation thermophile

II.5.1. L'adaptation thermophile au niveau des protéines

Les protéines sont thermostables, c'est à dire qu'elles présentent la capacité de résister et de conserver leurs fonctions à des températures élevées. Cependant, il n'existerait pas de mécanisme universel permettant d'expliquer cette thermostabilité. Il est surprenant d'observer que les protéines homologues mésophiles et hyperthermophiles diffèrent par leur température d'activité, mais sont très similaires en ce qui concerne leurs séquences en acides aminés et leurs structures tridimensionnelles. Cependant, le repliement des protéines semble être un facteur essentiel de la thermostabilité. A des températures identiques, les protéines hyperthermophiles seraient plus rigides, c'est à dire moins flexibles, que leurs homologues mésophiles. Par contre, la flexibilité conformationnelle de ces protéines est similaire à leurs températures physiologiques respectives (Zavodszky *et al.*, 1998).

D'autres propriétés communes aux protéines thermostables ont été identifiées, comme par exemple une augmentation des liaisons ioniques et hydrophobes déterminant la structure tertiaire (Trivedi *et al.* , 2006). Un fort taux d'acides aminés chargés, particulièrement à la surface des protéines, augmente les interactions ioniques, permettant également d'améliorer la thermostabilité de ces protéines (Fukuchi et Nishikawa, 2001). L'augmentation, parmi les thermophiles, de résidus chargés positivement (arginine et lysine) et négativement (acide glutamique) suggère que les liaisons ioniques entre ces résidus de charges opposées stabilisent les protéines à haute température.

Une étude propose, de plus, qu'il y aurait une réduction significative de la fréquence des acides aminés thermolabiles, comme l'histidine, la glutamine et la thréonine, chez les organismes thermophiles (Singer et Hickey, 2003). Des changements subtils dans la séquence en acide aminé des protéines semblent donc être suffisants pour provoquer des changements dans la structure tridimensionnelle et la thermostabilité des protéines. Il existe également des protéines chaperones, de type protéines de choc thermique hsp (heat-shockproteins), qui participent à la stabilisation

et au repliement des protéines chez les thermophiles. Un groupe particulier de protéines chaperones n'est exprimé qu'aux températures de croissances les plus élevées. Elles forment un complexe protéique cylindrique appelé thermosome (Phipps *et al.*, 1991).

II.5.2. L'adaptation thermophile au niveau de la membrane

Les membranes cellulaires sont des structures complexes se composant de lipides et de protéines agissant comme barrières entre le cytoplasme et l'environnement extracellulaire (Jaenicke et Sterner, 2006). Généralement, les bactéries et les eucaryotes contiennent des di-esters de glycérol et deux chaînes d'acyles gras, formant une membrane à double couche lipidique. Le maintien de la structure membranaire à température élevée implique chez les bactéries une augmentation du degré de saturation, de la longueur des chaînes d'acides gras et du rapport de ramification iso/antéiso (Konings *et al.*, 2002). Une composition plus élevée en acides gras saturés a comme conséquence une hydrophobicité plus forte contribuant à la stabilité des membranes aux températures élevées (Ferrera et Reysenbach, 2007).

II.5.3. L'adaptation thermophile au niveau génétique

In vitro, la température de dénaturation de l'ADN ou l'ARN double brin est affecté par la composition en nucléotides, et l'on pensait, par inférence, que les organismes vivants à une température élevée avaient sélectionné une plus haute proportion de G+C que de A+T dans leur génome, car reliées par trois liaisons hydrogènes qui stabiliseraient les brins d'ADN complémentaires. Ainsi, la structure secondaire des ARN serait stabilisée par un contenu élevé en paires de base GC et par des modifications post-transcriptionnelles (Kawai *et al.*, 1991). Or, à l'analyse d'un grand nombre de génomes séquencés, on pense maintenant qu'il n'y a pas de corrélation évidente entre le contenu en G+C du génome et la température optimale de croissance des organismes (Galtieret Lobry, 1997 ; Hurst et Merchant, 2001). Par exemple, l'archée *Pyrococcus abyssi* ou la bactérie *Aquifex aeolicus*, toutes deux hautement thermophiles, présentent un contenu en G+C inférieur à 50%, comme de nombreux micro-organismes mésophiles. D'autres mécanismes doivent donc participer à la stabilisation de la structure double brin de l'ADN. La sélection de certains dinucléotides semble contribuer à la thermostabilité.

En comparant les génomes d'organismes mésophiles à ceux d'organismes thermophiles, il a été observé une augmentation du taux de bases puriques dans le brin codant, chez les thermophiles (**Singer et Hickey, 2003**).

Des protéines participent également à la stabilisation de la structure double brin de l'ADN. Certaines, qui peuvent être des homologues fonctionnelles aux histones eucaryotes, compactent l'ADN pour former des structures similaires aux nucléosomes des eucaryotes (**Reddy et Suryanarayana, 1989 ; Sandman et Reeve, 2005**).

Les archées hyperthermophiles présentent de plus une topologie particulière de l'ADN. Une gyrase inverse, l'ADN topoisomérase de type I introduit des super-tours positifs dans l'ADN et cela contribue à stabiliser la double hélice d'ADN dans des conditions de températures élevées (**Forterre et al., 1989 ; Forterre et al., 1996**). Cette ADN gyrase inverse est caractéristique des hyperthermophiles, elle est absente chez tous les organismes présentant une température optimale de croissance inférieure à 80°C.

II.6. Grandes voies métaboliques des procaryotes thermophiles

II.6.1. Autotrophie

L'assimilation du CO₂ par les autotrophes est souvent associée au cycle de Calvin. Cependant, cette voie est peu fréquente chez les bactéries thermophiles et complètement absente chez les archées (Fig.05). Des voies alternatives d'assimilation du CO₂ existent chez ces organismes et incluent la voie du coenzyme A (CoA), le cycle d'acide citrique réducteur, le cycle du 3-hydroxypropionate, et le cycle du 4-hydroxybutyrate (**Holden, 2009**).

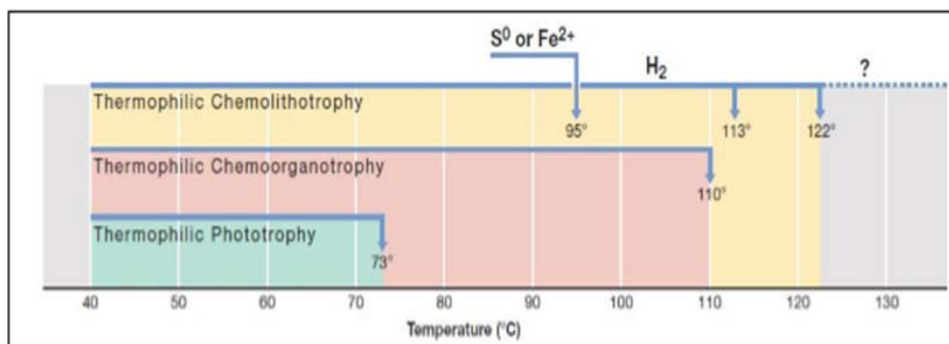


Figure 05. limites supérieures de température pour le métabolisme énergétique. **Photrophie** , *Synechococcus lividus* (bactéries, cyanobactéries) ; **chimiorganotrophie** , *Pyrodicticum occultum* (archée) ; **chimiolithotrophie** avec le soufre élémentaire comme donneur d'électrons, *Acidianus infernus* (archée) ; chimiolithotrophie avec le fer ferrique comme donneur d'électrons, *Ferroglobus placidus* (archée) ; chimiolithotrophie avec l'Hydrogène gazeux comme donneur d'électrons, *Methanopyruskandleri* (archée, 122°C) (Madigan *et al.*, 2010).

Figure 05 : limites supérieures de température pour le métabolisme énergétique. (Madigan *et al.*, 2010).

II.6.2. Hétérotrophie

La majorité des microorganismes thermophiles sont hétérotrophes ou autotrophes facultatifs. Les glucides et les peptides sont les plus assimilés par les thermophiles et hyperthermophiles et beaucoup de thermophiles utilisent également les hydrocarbures comme sources de carbone et d'électrons (Holden, 2009 ; Marchant et Banat, 2010).

II.6.3. Oxygène

La plupart des thermophiles et l'ensemble des hyperthermophiles sont des anaérobies, en raison de l'insolubilité de l'O₂ dans l'eau aux températures élevées et au faible contact entre la surface liquide et l'O₂. Cependant, il existe plusieurs organismes qui sont aérobies obligatoires, microaérophiles, ou anaérobies facultatifs. Ces organismes sont généralement rencontrés dans les environnements géothermiques comme les sources thermales terrestres qui rentrent facilement en contact avec des environnements oxygènes. Lors de la respiration aérobie, les électrons portés par le cytochrome C sont transférés à l'O₂ par le biais du cytochrome oxydase C. Diverses formes de cette enzyme sont trouvées chez *Aeropyrum* et *Pyrobaculum* tandis que des hydroquinones oxydases sont trouvées chez *Sulfolobus* et *Acidianus*. *Pyrobaculum*

oguniense possède deux cytochromes a et o à hème cuivre. Le complexe bc1 et le cytochrome oxydase o sont présents dans les membranes cellulaires développées en conditions aérobies et anaérobies tandis que le cytochrome oxydase, est présent uniquement en conditions aérobies (**Holden, 2009**).

II.7. Les besoins nutritifs des bactéries thermophiles

Les bactéries thermophiles ont parfois des besoins nutritifs particuliers voire même essentiels. Plusieurs auteurs ont rapporté ces observations, comme par exemple (**Surucu, 1999**). Dans ses travaux, il expose les besoins spécifiques des thermophiles au niveau des acides aminés, des vitamines et des minéraux. La méthionine s'avérait être absolument essentielle dans ce cas, alors que l'histidine stimulait la croissance. Les minéraux, le magnésium, mais aussi le calcium et le fer, semblent très importants.

III.1. Introduction

La découverte des sources hydrothermales profondes, de manière générale l'étude de milieux extrêmes, plus spécialement les thermophiles, représentent une nouvelle frontière pour la biotechnologie. Les travaux de recherche sur ces organismes sont pour une grande part motivés par les applications biotechnologiques. Ils ont ouvert la voie à la mise en évidence de microorganismes bien adaptés à ces conditions atypiques et capables de synthétiser de molécules d'intérêt biotechnologique. Des applications différentes peuvent être distinguées. Le premier repose sur l'utilisation directe des organismes et le second sur leur biomolécules.

III.2. Utilisation directe des thermophiles

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. Parmi les applications des thermophiles :

III.2.1. Agents de minéralisation

Dans les traitements industriels de minéraux, des microorganismes oxydant le soufre et le fer sont employés pour libérer l'or inclus dans les minéraux sulfurés et dans la concentration des métaux lorsque les procédés chimiques conventionnels ne sont pas rentables. Parmi les archées réductrices de fer, *Pyrobaculum islandicum* et *Pyrobaculum furiosus*, ont la capacité de transformer le chlorure d'or en or insoluble (Lloyd *et al.*, 2003).

Alors que les acidothermophiles comme *Sulfolobus metallicus* et *Metallosphaerasedula* sont utilisées dans l'extraction du cuivre à partir de minéraux sulfurés ou encore dans le traitement de certains minerais sulfurés tels que la pyrite (Norris *et al.*, 2000 ; Rawlings et Johnson, 2007).

La manipulation et la réutilisation des pneus épuisés posent de sérieux problèmes et le recyclage des matériaux en caoutchouc est préférable d'un point de vue économique et environnemental. L'espèce *Pyrobaculum furiosus* est capable de désulfurer le caoutchouc en donnant un produit avec de bonnes propriétés mécaniques (Bredberg *et al.*, 2001).

En outre, les sols contaminés avec des alcanes linéaires et ramifiés (C20-C40), des hydrocarbures aromatiques (phénol, toluène, pyrène, phenanthrène, anthracène) insolubles à basses températures, peuvent être décontaminés avec les microorganismes thermophiles (**Antranikian, 2009 ; Banat et Marchant, 2011**).

III.2.2. Piles à combustible microbiennes

Le principe est d'utiliser des microorganismes capables d'oxyder des composés organiques ou inorganiques en couplage avec la réduction d'une électrode dans une pile à combustible pour produire un courant électrique (**Quérellou et Guézennec, 2010**).

Les thermophiles constituent un gisement très largement inexploré dans ce domaine. Une étude réalisée a 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**).

III.2.3. Production d'hydrogène

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**). Des hydrogénases archéennes ont été la cible de recherche intensive. Une NiFe hydrogénase cytoplasmique issue de l'hyperthermophile *Thermococcus kodakaraensis* est active de façon optimale à 90°C pour la production d'hydrogène avec le méthylviologène comme substrat (**Kanai et al., 2003**).

III.3. Applications indirectes

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

❖ Enzymes

Le marché global des enzymes industrielles et de spécialité était estimé à 3,6 milliards de dollars en l'an 2000. Moins de 30 enzymes comptent pour plus de 90% des enzymes industrielles utilisées. La grande majorité de celles ci sont cependant fragiles et peu résistantes dans les conditions d'usage industriel, d'où la recherche

d'enzymes de substitution plus robustes (température, pH et pression). Celles issues des microorganismes des sources hydrothermales présentent a priori un potentiel important en raison de leur thermostabilité.

III.3.1. La bioconversion de l'amidon en sirop

Plusieurs secteurs industriels trouvent des applications pour les thermozyms. L'industrie de l'amidon est une grosse consommatrice d'enzymes pour l'hydrolyse et la modification de cette matière première. Elle requiert l'utilisation d'amylases et de pullulanases efficaces pour faire la bioconversion de l'amidon en sirop de dextrose, qui par exemple, servira à alimenter d'autres industries en substrats fermentescibles. Des amylases et des pullulanases d'intérêt ont en effet été isolées à partir de bactéries appartenant aux espèces *Bacillus et Thermococcus*, par exemple (**Haki et Rakshit, 2003**).

III.3.2. La bioconversion de cellulose en glucose

La cellulose est le polymère naturel le plus abondant sur Terre, étant la composante structurale principale des plantes. Elle se compose d'unités de glucose reliées linéairement par des liens glucosidiques β -1,4. La structure intrinsèque de ce polymère le rend très résistant à la digestion et à l'hydrolyse. La bioconversion de la cellulose en glucose nécessite l'emploi de cellulase. Des espèces de *Pyrococcus* et de *Thermotoga* produisent des cellulases dont les températures optimales d'activité dépassent les 95°C. Actuellement, les cellulases sont utilisées, entre autre, au niveau de détergents, dans le prétraitement de déchets industriels et pour la production de bioéthanol (**Haki et Rakshit, 2003 ; Vieille et Zeikus, 2001**).

III.3.3. Dégradation de la chitine

Si la cellulose est le polymère naturel le plus abondant sur Terre, la chitine est certainement le deuxième plus abondant. Il s'agit d'un polymère linéaire de N-acétylglucosamine relié par des liens β -1,4. Dans la nature, la chitine est la composante principale de la paroi cellulaire de champignons, de l'exosquelette des arthropodes, comme les crustacés (P.ex. crevettes, crabes), et des insectes. La chitine et ses dérivés, comme le chitosane, ont beaucoup d'applications dans les domaines alimentaire, agrochimique, pharmaceutique et des cosmétiques. Afin de la rendre accessible pour ces diverses applications, la chitine/chitosane doit souvent être digérée par des chitinases/chitosanases qui hydrolysent les liens glucosidiques du polymère et par des déacétylases qui déacétylent la glucosamine.

Plusieurs espèces thermophiles de *Bacillus* ont été rapportées comme producteurs de telles enzymes (**Haki et Rakshit , 2003**).

III.3.4. Les lipases

Depuis plusieurs années les lipases apparaissent comme des enzymes clés en biotechnologie. Leur multiples propriétés en font des candidates idéales pour les industries agro-alimentaire (p.ex. fabrication d'huiles, traitement des eaux usées), des détergents (p.ex. élimination des taches grasses), des pâtes et papiers (p.ex. nettoyage des équipements) et en synthèse organique. (**Schmidt-Dannert *et al.*, 1997**).

Les activités des lipases bactériennes sont optimales généralement entre 30 et 60°C. Toutefois, il existe des cas où la température optimale des lipases se retrouve dans des intervalles inférieurs ou supérieurs. Il suffit de penser aux lipases thermostables pour trouver des exemples d'enzymes où l'activité est optimale à des températures supérieures à 60°C. par exemple, *Geobacillus thermocatenulatus* produit une lipase dont l'activité maximale est à 75°C en utilisant la Trioléine comme substrat (**Schmidt-Dannert *et al.*, 1997**).

Dans certain cas la thermostabilité des lipases peut être augmentée par l'addition de stabilisateurs. Par exemple l'ajout d'éthylène glycol, de sorbitol ou de glycérol permet d'augmenter la thermostabilité de la lipase produite par *bacillus sp.* (**Nawani et kaur, 2000**).

- **Autres enzymes**

De nombreuses autres enzymes issues des thermophiles présentent un intérêt biotechnologique potentiel :

- ❖ Les nitrilases (EC 3.5.5.1) : dans la conversion de nitriles en acides carboxyliques ;
- ❖ les décarboxylases (EC 4.1.1) catalysent la formation et le clivage des liaisons C; réaction clé dans la production de blocs chiraux dans la synthèse de produits pharmaceutiques ;
- ❖ les hydroxylases aromatiques (EC 1.14.13.) produisent des composés phénoliques réactifs à partir de substances aromatiques ;

IV.1. Echantillonnage

IV.1.1. Préparation du matériel

L'échantillon prélevé doit être représentatif, il doit donc être effectué à la source même et obtenu sans modifier les caractères physico-chimiques de l'eau.

Les échantillons sont prélevés dans des flacons en verre stériles et bien rincés avec l'eau à échantillonner pour éviter toutes contaminations possibles (fig.06) (Berkani, 2011).



Figure 06 : Flacon rincé à l'eau de l'échantillon

IV.1.2. Mesure des paramètres de l'eau

Deux éléments ont été mesurés *in situ* : la température (C°) de l'eau et le pH. On utilise un multi paramètre de type « Consort C535 » pour réaliser ces mesures (fig 07).

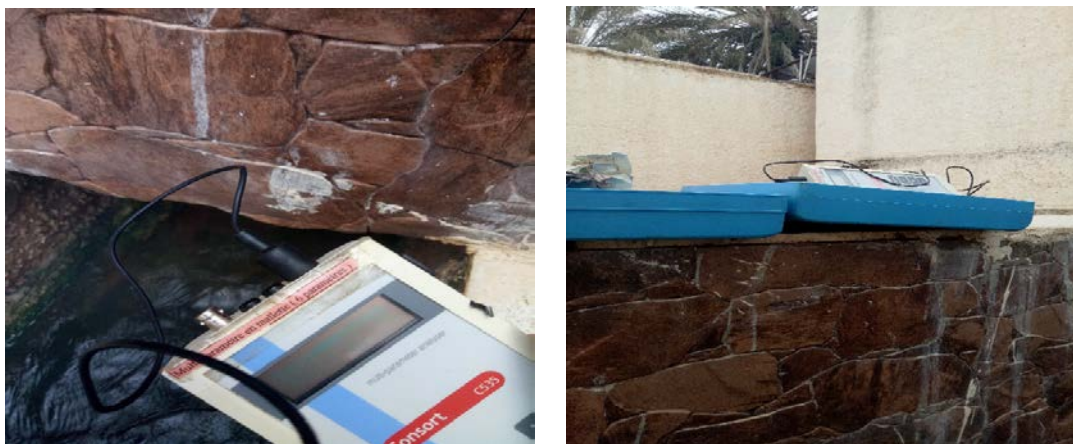


Figure 07 : Multi paramètre (Consort C535).

IV.1.2.1. Mesure de la température

La température de l'eau doit être mesurée à l'émergence même et avec précision. Donc à l'aide de perche ou de corde on rapproche la sonde de la source (fig 08). En effet, celle-ci joue un rôle dans la solubilité des sels et surtout des gaz, dans la dissociation des sels dissous donc sur la conductivité électrique, dans la détermination du pH, pour la connaissance de l'origine de l'eau ; etc.

IV.1.2.2. Mesure de pH

La mesure est réalisée selon les étapes suivantes (fig 08):

- ✓ Plonger la sonde du pH mètre dans l'eau ;
- ✓ Attendre quelques secondes la stabilisation de l'affichage sur l'écran, puis lire le résultat de la mesure.



Figure 08 : Mesure de pH et la température

IV.2. Isolement et identification des bactéries

IV.2.1. Isolement et purification

L'isolement est effectué par étalement de 0,1 ml de l'échantillon d'eau thermale ou de ses dilutions sur cinq milieux de cultures différents préparés au laboratoire (**Annexe 01**), ces derniers sont peu sélectifs et conçus pour cultiver le plus grand nombre des thermophiles possible. L'incubation est faite à 55 °C pendant 48 heures. Ces conditions sont les plus couramment utilisées pour l'étude des bactéries thermophiles (**Yavuzl *et al.*, 2004 ; Goodfellow et Jones , 2009 ; Logan *et al.*, 2009**).

De chaque milieu, environ une dizaine de colonies d'aspect différent est prélevée et purifiée par repiquages successifs sur les mêmes milieux solides.

IV.2.2. Aspects macroscopique et microscopique des souches étudiées

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé de la durée et de la température de l'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées.

Les colonies sont réparties en 11 souches selon : la taille, la forme, l'aspect de la surface et la couleur. Pour chaque souche, une coloration de Gram est réalisée.

IV.2.3. Caractérisation biochimique

IV.2.3.1. Test de catalase

La catalase permet la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit par la souche. Sa recherche consiste à mettre en contact une colonie de l'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**).

IV.2.3.2. Utilisation de substrats carbonés

L'utilisation des substrats-tests comme source unique de carbone, d'énergie et/ou d'azote a été testée sur le milieu 1 (Gélose nutritive additionnée) et dépourvu de toute source organique et additionné de NH_4Cl ($0,5 \text{ g.l}^{-1}$), et de KH_2PO_4 ($0,005 \text{ g.l}^{-1}$). Les substrats sont rajoutés à une concentration finale de 1 % pour les sucres et de 0,1 % pour les alcools, les acides organiques et l'acide aminé (**Gordon et al., 1973**).

IV.2.3.3. Réaction au rouge de méthyle (RM)

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

IV.2.3.4. Recherche de l'uréase

L'enzyme hydrolysant l'urée est recherchée sur une gélose à l'urée de Christensen. La production de l'uréase libère le carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu d'où virage de l'indicateur coloré de l'orange en rose ou en rouge-violacé (**Harley et Prescott, 2002**).

IV.3. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

Les isolats sont soumis à une recherche qualitative d'hydrolases extracellulaires à 55°C. Le milieu 1 solide est modifié par réduction de la source organique (milieu de base) et l'addition du polymère-test (**Demirjianet al., 1999 ; Tholey et Heinzle., 2002**).

La composition des milieux modifiés utilisés est rapportée dans l'Annexe 01.

IV.3.1. 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 (Annexe 02). La présence de zones claires autour de l'ensemencement témoigne de la production d'amylases (**Gordon et al., 1973**).

IV.3.2. Protéases

IV.3.2.1. 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**).

IV.3.2.1. 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. L'hydrolyse de la gélatine est indiquée par l'apparition de zones claires autour des stries (**Frazier, 1926**).

IV.3.3. Activités lipolytiques (hydrolyse des Tween 20 et 80)

L'estérase est recherchée par le test d'hydrolyse des Tween 20 et 80. Ces deux produits stériles sont rajoutés à une concentration de 1% (v/v) au milieu de base stérile en surfusion. Les boîtes de Pétri ensemencées 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**).

IV.4. Résistance des isolats aux températures élevées

Etant donné que la plupart des applications bactériennes en industrie agro-alimentaire se font à haute température, les souches donnant des résultats positifs d'activités hydrolytiques extracellulaires, sont incubées à 60°C, 65°C et 70°C pendant 24 heures pour tester la tolérance aux températures élevées

V.1. Analyse physico-chimique des échantillons d'eau

Un échantillon d'eau a été prélevé le 04/04/2017 à 7:30 h à partir de la source thermale principale de Hammam El Salhine.

Trois mesures successives de température et de pH ont été réalisées. On note que la source étudiée est caractérisée par une température qui varie de 64 à 67°C et un pH de 7.7 à 7.8.

V.2. Isolement et caractérisation des isolats

Pour l'isolement des bactéries thermophiles, on a utilisé dans notre étude des milieux considérés comme sélectifs pour ce type des bactéries.

L'identification se basait sur les méthodes classiques telles que la forme, la taille, l'aspect des colonies, la coloration de Gram ainsi que des tests biochimiques.

V.2.1. Aspects macroscopique et microscopique des souches étudiées

Après une incubation à 55°C, pendant 24 à 48 h, on observe des colonies d'aspects différents ; plate, rugueuse, lisse ou bombée ; de forme irrégulière ou rond ; et de couleur beige, blanche ou jaune (Tab. 3; fig 09)

L'observation microscopique après coloration de Gram permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce bactérienne et à l'issue de cette observation, on peut distinguer des cellules en formes de cocci, bacilles ou coccobacilles Gram positif et Gram négatif (tab.03).

Tableau 03 : caractéristiques macroscopique et microscopique des isolats par milieu de culture utilisé.

Souches	Milieux	Type de colonie			Observation microscopique
		Couleur	Aspect	Forme	
01	02	Beige	Lisse Bombée	Ronde	Cocci Gram négatif
02	02	Beige	Plate rugueuse	Irrégulière	Coccobacille Gram positif
03	02	Jaune foncé	Lisse Bombée	Ronde	Coccobacille Gram positif
04	03	Jaune	Bombée Rugueuse	Dentelée	Cocci Gram négatif
05	03	Jaune	Plate Rugueuse	Irrégulière	Cocci Gram positif
06	02	Blanc	Plate Rugueuse	Irrégulière	Bacille Gram positif
07	05	Beige	Plate Rugueuse	Irrégulière	Cocci diploïde Gram négatif
08	04	Transparente Blanchâtre	plate	Ronde régulière	Cocci diploïde et en chainette Gram positif
09	04	Blanc	Plate Rugueuse	Filamenteuse	Cocci en chainette Gram positif
10	01	Beige	Plate sèche	Irrégulière	Cocci Gram négatif
11	02	Jaune avec centre foncé	Lisse bombée	Ronde	Bacille Gram négatif

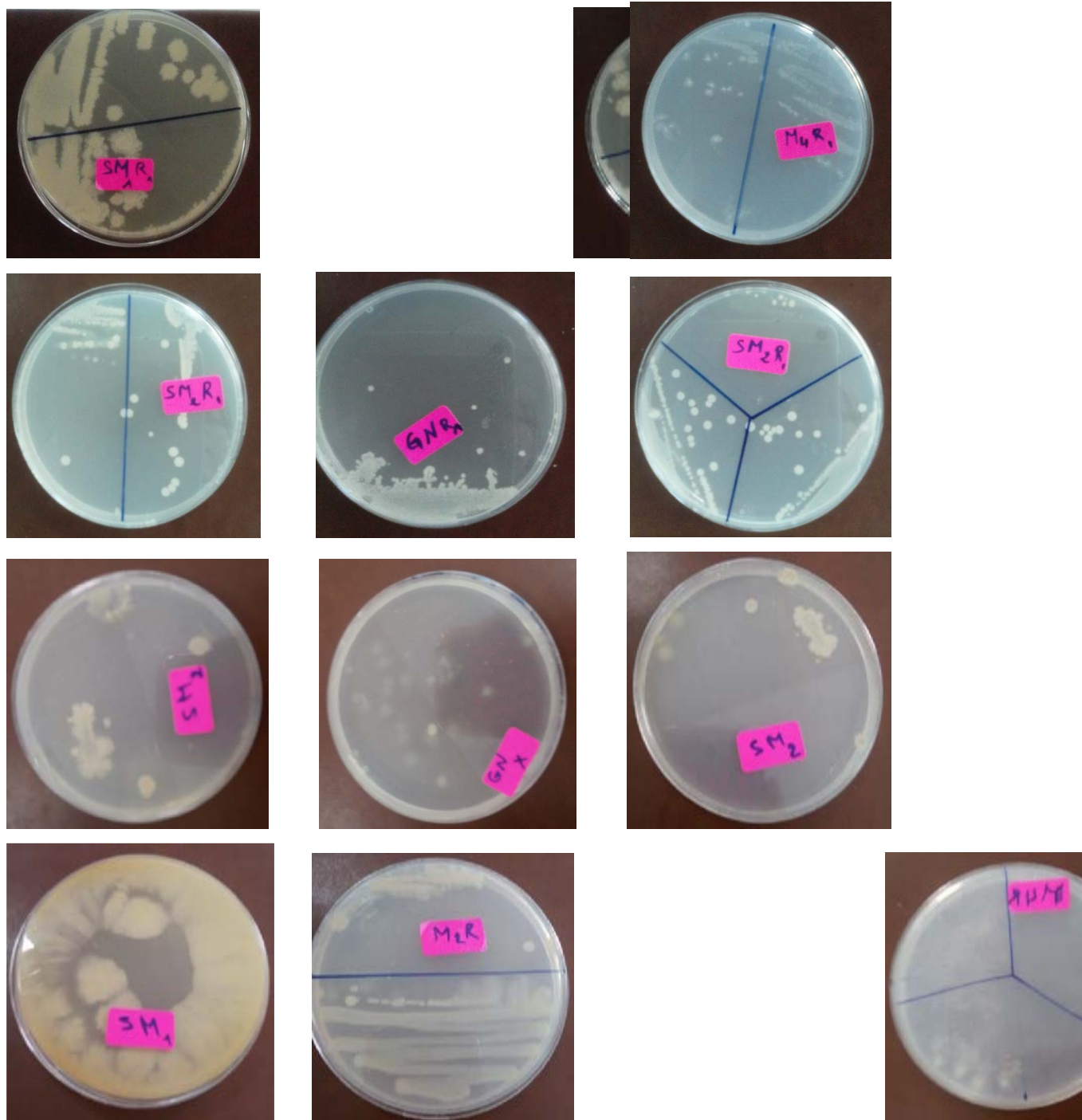


Figure 09 : Aspects macroscopiques des souches isolées cultivées sur les milieux 1, 2, 3, 4 et 5 /M : milieu .R : repiquage.

V.2.2. Résultats de la caractérisation biochimique

V.2.2.1. Test de la catalase

Selon ce teste, on trouve qu'il y a 7/11 souches qui possèdent la catalase (Tab.04).

V.2.2.2. Réaction au rouge de méthyle (RM)

Toutes les espèces étudiées possèdent une réaction négative vis à vis du rouge de méthyle (Tab.04).

V.2.2.3. Recherche de l'uréase

Sept souches sur onze (à 63.63 %) se sont révélées uréase positive et les autres négatives (Tab.04,; fig 10)

Tableau 04 : Caractérisation biochimique des isolats

Souches	Catalase	Rouge de méthyle	Uréase
1	+	-	-
2	-	-	-
3	+	-	+
4	+	-	-
5	-	-	+
6	+	-	-
7	+	-	+
8	-	-	+
9	-	-	+
10	+	-	+
11	+	-	+

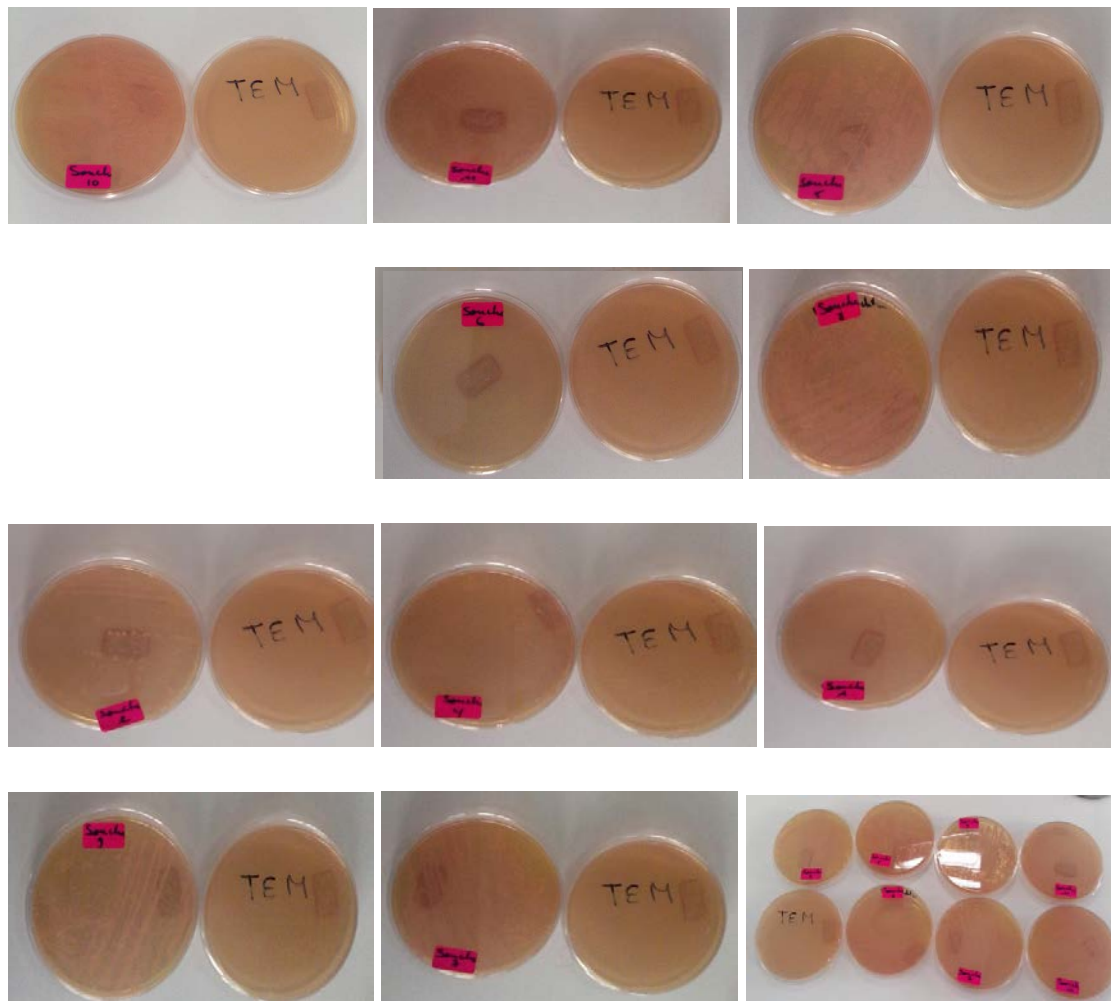


Figure 10 : Résultat de teste d'uréase sur les 11 souches cultivées.

V.2.2.4. Utilisation des substrats carbonés

Les résultats de croissance sur les différents substrats testés comme unique source de carbone, d'énergie et d'azote sont présentés dans le tab.5. Les sucres les plus assimilés par les isolats sont : le saccharose, le maltose et le lactose (fig 11, 12, 13,14 ,15 et 16)

Tableau 05 : Utilisation des substances organiques.

Souches	Saccharose	Glucose	Fructose	Galactose	Maltose	Lactose
1	+	-	-	-	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+
6	+	-	+	-	+	+
7	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+

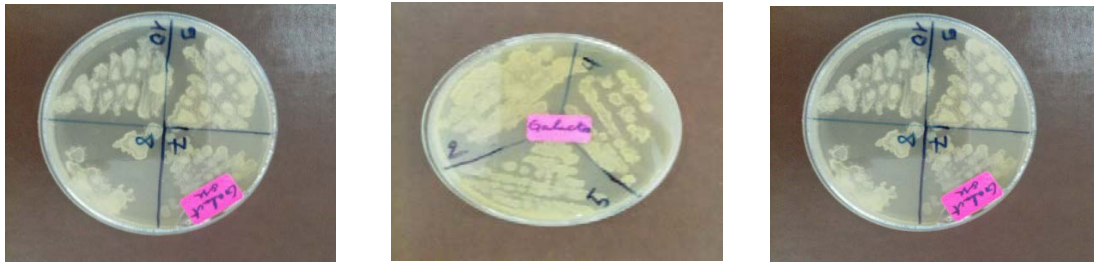


Figure 11 : Aspects macroscopiques des souches qui utilisent le galactose comme substrat carboné.



Figure 12 : Aspects macroscopiques des souches qui utilisent le fructose comme substrat carboné.



Figure 13 : Aspects macroscopiques des souches qui utilisent saccharose comme substrat carboné.



Figure 14 : Aspects macroscopiques des souches qui utilisent le glucose comme substrat carboné.

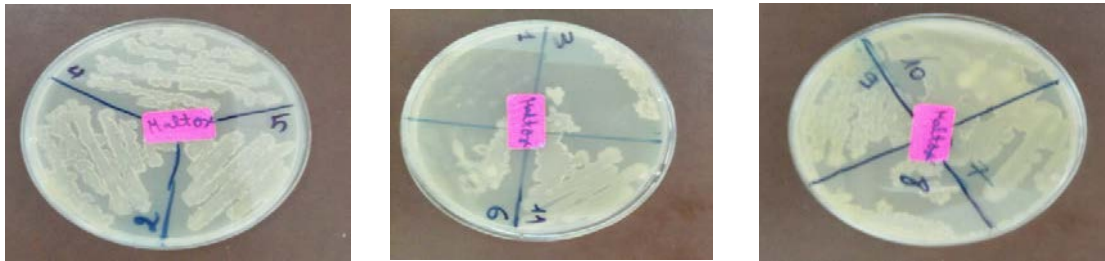


Figure 15 : Aspects macroscopiques des souches qui utilisent le maltose comme substrat carboné.

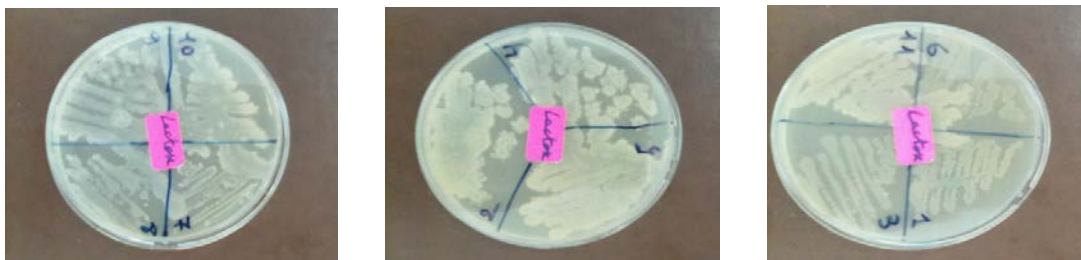


Figure 16 : Aspects macroscopiques des souches qui utilisent le lactose comme substrat carboné

V.3. Résultats d'identification des souches

D'après les résultats obtenus sur la base des différents tests réalisés et selon les travaux suivants ; **Gomri, 2011**, nous pouvons attribuer les isolats des bactéries thermophiles de la source thermale Hammam El Salhine aux genres suivants : *Thermobacillus*, *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Caldimonas*, *Laceyella*, *Caldibacillus* et *Kroppenstedtia* (tab.06)

Tableau 06 : Résultats d'identification des 11 souches étudiées

Souche	Genre
Souche 1	<i>Thermobacillus</i>
Souche 2	<i>Anoxybacillus</i>
Souche 3 Souche 5	<i>Geobacillus</i>
Souche 4	<i>Caldimonas</i>
Souche 6	<i>Laceyella</i>
Souche 7 Souche 10 Souche 11	<i>Caldibacillus</i>
Souche 8 Souche 9	<i>Kroppenstedtia</i>

V.3. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires des souches obtenues

Des tests d'activités amylolytique, protéolytique et lipolytique ont été effectués. La présence de ces activités a été détectée en utilisant les substrats suivants : amylase, gélatine, caséine, tween 20 et tween 80. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 07 (fig 17, 18, 19, 20, et 21)

Tableau 07 : Activités hydrolytiques des souches étudiées.

Souches	Amylase	Tween 20	Tween 80	Caséine	Gélatine
1	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	-	+
4	+	-	-	+	+
5	+	-	+	-	+
6	+	+	+	+	-
7	-	-	-	-	+
8	-	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	-	+	+
11	-	+	-	-	+

**Figure 17** : Aspects macroscopiques des souches qui d'hydrolysent l'amylase.

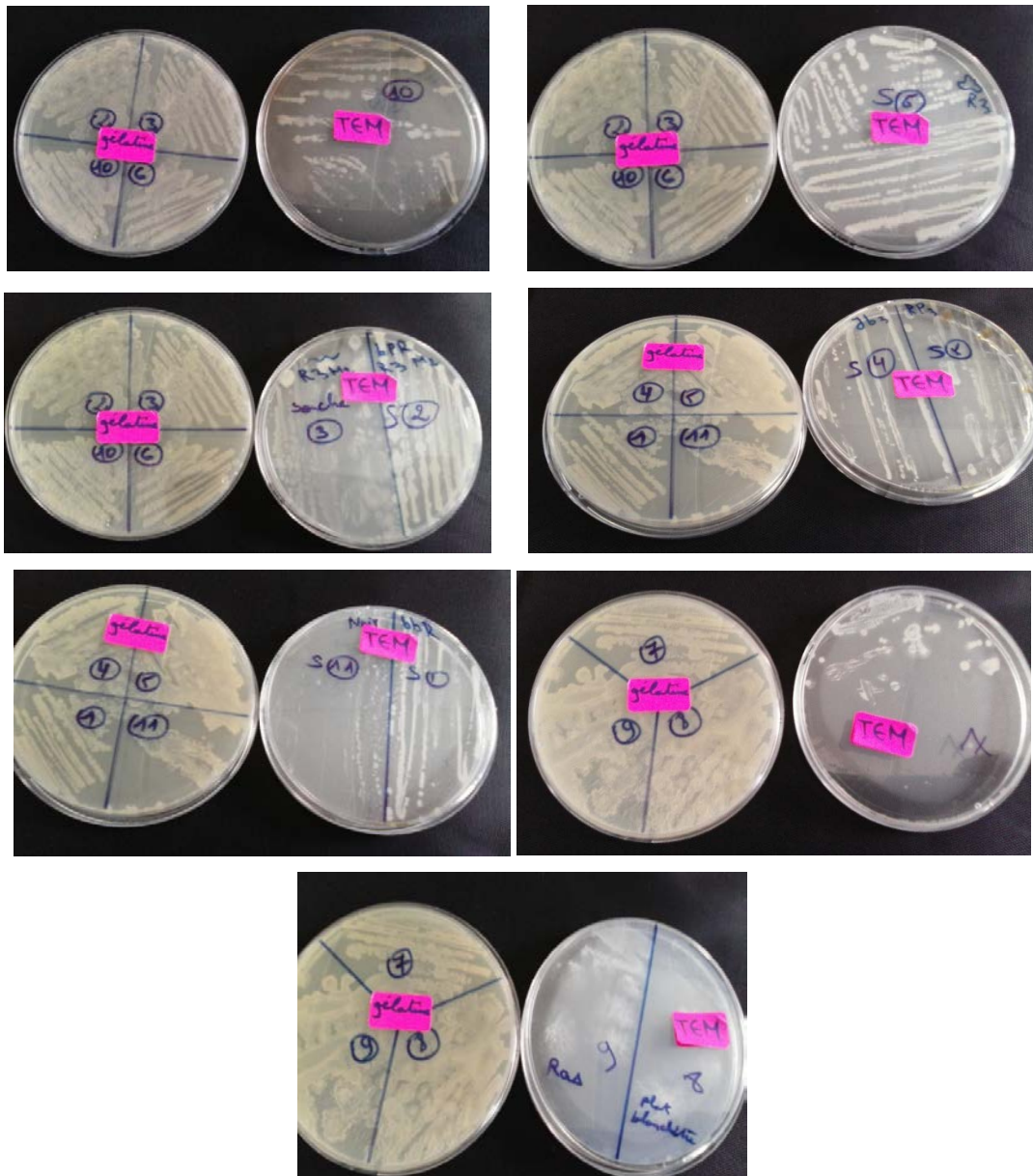
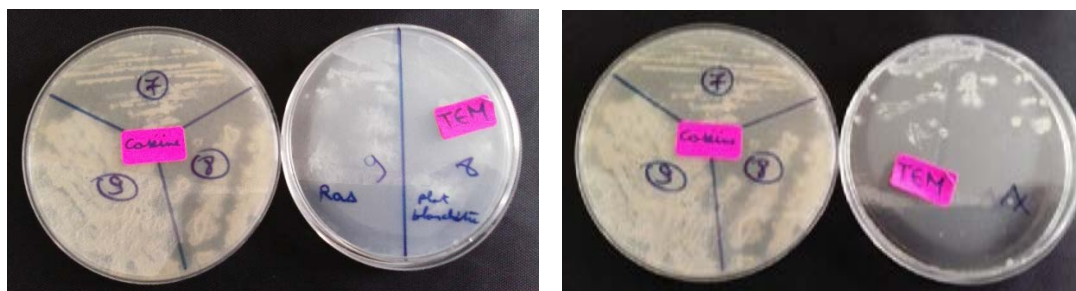


Figure 18 : Aspects macroscopiques des souches qui d'hydrolysent la gélatine.



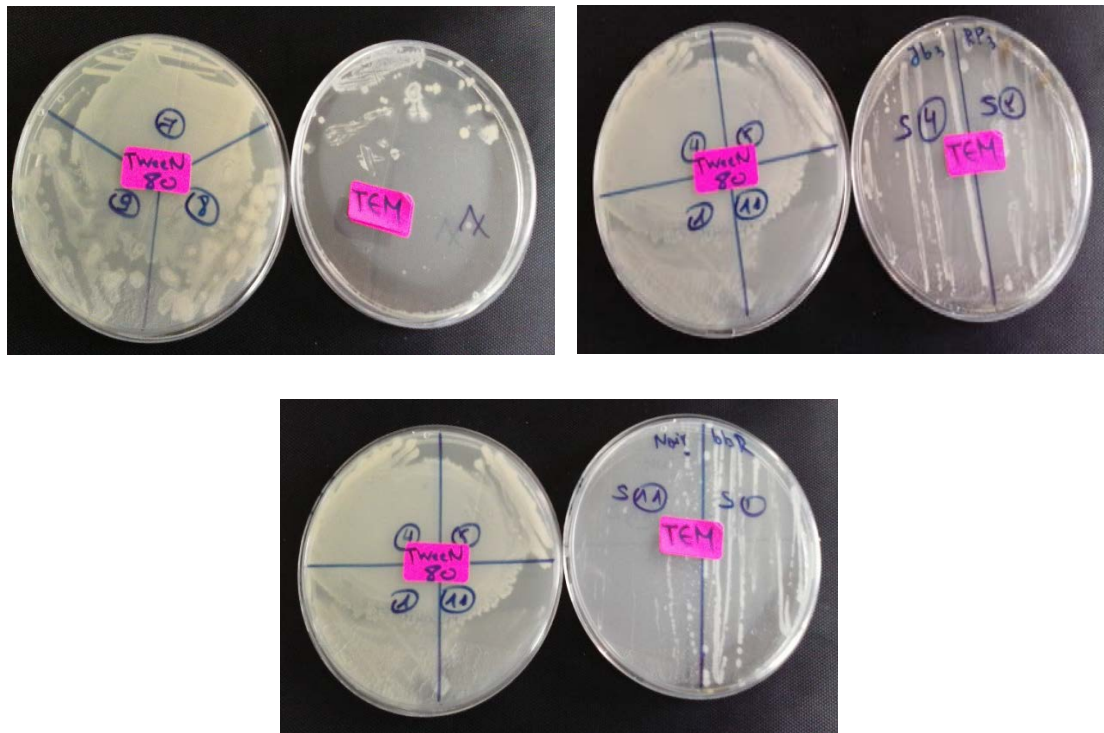
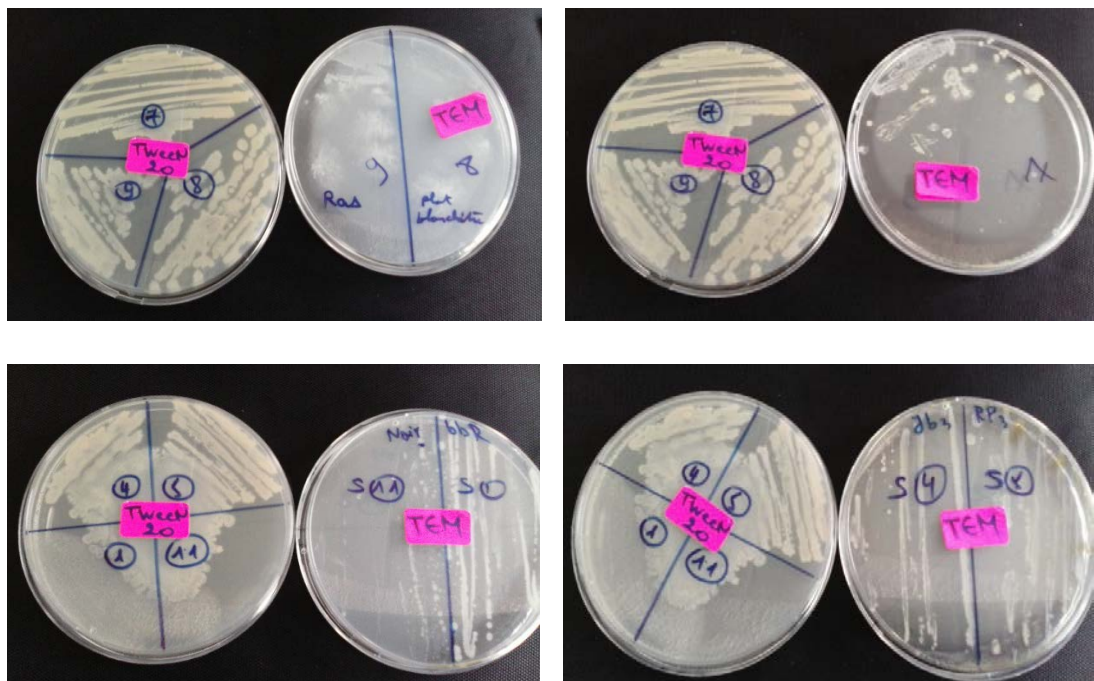


Figure 20 : Aspects macroscopiques des colonies des souches qui d'hydrolysent le tween 80.



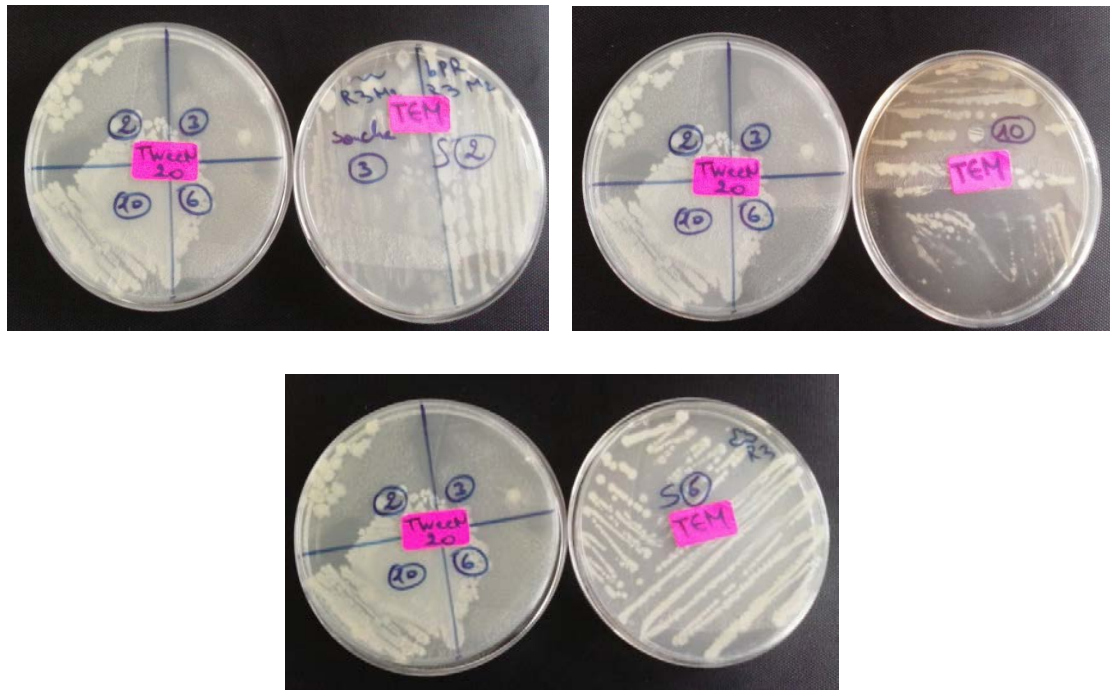


Figure 21 : Aspects macroscopiques des colonies des souches qui d'hydrolysent le tween 20.

V.4. Stabilité thermique des souches étudié

Les 11 souches donnant des résultats positifs pour les tests de la tolérance aux températures élevées, après leurs incubations à 60°C, 65°C et 70°C pendant 24 heures.

V.5. Discussion

La première étape de ce travail a consisté à établir une collection de 11 souches de bactéries thermophiles, à partir d'un échantillon d'eau d'une source thermale de Hammame El-Salhine, réparties en sept genres : *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Caldimonas*, *Laceyella*, *Caldibacillus*, *Kroppenstedtia* et *Thermobacillus*. Les milieux de culture ayant servis à leur isolement sont utilisés pour l'étude d'une large panoplie de microorganismes thermophiles aérobies appartenant à plusieurs genres.

Ces microorganismes apparaissent comme des représentants notoires des sources hydrothermales terrestres ou sub-terrestres, et communs aux écosystèmes chauds de la planète que ce soit sur le continent Européen, Américain, Africain ou Asiatique. Ils peuvent être considérés comme des marqueurs biologiques des sources thermales qu'elles soient terrestres ou sub-terrestres (**Adiguzel et al., 2009 ; Ferrera et Reysenbach, 2007 ; Grégoire et al., 2009**). En effet, une étude de biodiversité menée par des techniques de biologie moléculaire sur l'eau de la source chaude de hammam Debagh (Meskhoutine), a montré la présence des espèces de genre *Geobacillus* et d'*Anoxybacillus* (**Grégoire et al., 2009**).

Caldimonas a été également isolé d'une source thermale naturelle à Tozeur, une oasis dans le Sud-Ouest de la Tunisie. Cette dernière est une bactérie thermophile, Gram négative amylolytique (**Bouroui et al., 2010**). Alors que les bactéries qui appartiennent au genre *Laceyella* ont été déjà isolées à partir des sources thermales au Sud-Ouest de la Chine et est utilisable pour la liquéfaction de la gélatine, la peptonisation et la coagulation du lait.

Des études antérieures ont montré la capacité ces bactéries thermophiles à croître sur le glucose et/ou les sucres fermentescibles comme unique source de carbone et d'énergie, c'est le cas des genres *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Thermobacillus* et *Caldibacillus* qui appartiennent au groupe 5 de bacilles selon la classification numérique de **Priest (1988)**.

Les souches de *Geobacillus* ont été étudiées pour leur capacité de dégrader plusieurs polysaccharides, notamment la cellulose et également pour leur importantes protéases thermostables, cas de la thermolysine. Ces enzymes ont été proposées pour des applications industrielles et environnementales.

Anoxybacillus est un genre relativement nouveau qui a été proposé en l'an 2000. Parce que ces bactéries sont des thermophiles tolérants aux alcalis, elles conviennent à de nombreuses applications industrielles. Plus d'une décennie après le premier rapport d'*Anoxybacillus*, les connaissances accumulées à partir d'études fondamentales et appliquées suggèrent que ce genre peut servir de bonne alternative dans de nombreuses applications liées à l'amidon et à la biomasse lignocellulosique, au traitement des déchets environnementaux, à la technologie enzymatique et éventuellement à la production de bioénergie. Des comparaisons avec d'autres membres de *Bacillaceae* et d'éventuelles applications futures d'*Anoxybacillus* sont également discutées (**Schleifer & Kandler, 1972**).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude des bactéries d'une source thermale terrestres de l'Est Algérien, Hammam El Salhine, a révélée l'existence d'une grande diversité représenté par sept genres ; *Thermobacillus*, *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Caldimonas*, *Laceyella*, *Caldibacillus* et *Kroppenstedtia*. Ces derniers sont parmi les extrémophiles 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. En effet, de souches obtenues se développent de façon optimale à des températures supérieures à 50°C, soit à 70°C.

La totalité des souches obtenues, donnent des résultats prometteurs des activités hydrolytiques extracellulaires, amylolytique, lipolytique et même pour l'activité protéolytique.

En fin, ce travail qui représente une contribution à l'identification des bactéries thermophile et un screening des activités hydrolytiques extracellulaires doit d'abord être compléter par une identification polyphasiques des souches obtenus en suite de la détermination du potentiel biotechnologique plus approfondi pour d'éventuelles applications dans les domaines industriel et/ou environnemental.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **ANDRE B. (2003)**. Bénédicte Leclerc. La vie est-elle universelle, édition bulles de scien. p 155-206.
- **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 p. CRC Press, New York.
- **ANTRANIKIAN G. (2009)**. Extremophiles and Biotechnology in: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester; P: 1-5.
- **ATHAMENA M. (2006)**. Etude des ressources thermales de l'ensemble allochtone Sud Sétifien. Mémoire de Magistère Option : mobilisation des ressources hydriques. Faculté des sciences de l'ingénieur. Université de Batna. 76 p.
- **AUBY J.F. (1994)**. Les Eaux minérales. Collection Que-sais-je. Editions Presses Universitaires de France (PUF) Paris, N° 2802. 128 pp.
- **BERKANI C. (2011)**. Etude hydrochimique des sources thermales des Aurès. Mémoire de Master. Département d'écologie. Univ. Khenchela. pp 23, 24, 47, 51, 52, 53.
- **BLANCHARD R. M. (1946)**. Les sources thermo-minérales. Hydrogéologie, Géochimie, Biologie. In : Revue de géographie alpine, tome 34, n°2, pp. 325-326.
- **BLAVOUX B. (1995)**. Apports des techniques isotopiques à la connaissance des gisements d'eau minérale. Société Hydrotechnique de France La Houille Blanche n° 2/3- p. 51-58.
- **BOURAOUI H., BOUKARI I., TOUZEL, J. P., O'DONOHUE M., & MANAI M. (2010)**. Caldimonas hydrothermale sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from roman hot bath in south Tunisia. *Archives of microbiology*, 192(6), 485-491p.
- **BREDBERG K., PERSSON J., CHRISTIANSSON M., STENBERG B. & HOLST O. (2001)**. Anaerobic desulfurization of ground rubber with the

- thermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*-a new method for rubber recycling. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55:43- 48 p.
- **CALTEAU A. (2005).** Relations évolutives entre les bactéries et les archées hyperthermophiles. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Université de Bretagne Occidentale, France. pp 21-23.
 - **CAMINITI, MOUSSA A. M., FOUQUET N., LE GALL Y., ROLET B., BOHN J. & JALLUDIN M. (2012).** First evidence of epithermal gold occurrences in the SE Afar Rift, Republic of Djibouti. *Mineralium Deposita*, vol. 47, no 5, p. 563-576.
 - **CASTANY & MARGAT (1977).** Dictionnaire français d'hydrogéologie. Éditions du BRGM Frontispice de l'ouvrage : « De l'origine des fontaines » de Perrault (1674), p 205,1625.
 - **DEMIRJIAN D.C., SHAH P.C. & MORI V. F. (1999).** Screening for novel enzymes. Topics Curr. Chem., 200:1-29.
 - **EUROTHERMES (AVRIL 2017).** Extracellular enzyme producing thermophilic bacilli from Balcova (Agamemnon) geothermal site by ITS rDNA RFLP. J. of Appl. Microbiol., 97:810-817.
 - **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
 - **FUKUCHI S. & NISHIKAWA K. (2001).** Protein surface amino acid compositions distinctively differ between thermophilic and mesophilic bacteria. J Mol Biol 309: 835-843.
 - **GALTIER N. & LOBRY J.R. (1997).** Relationships between genomic G+C content, RNA secondary structures, and optimal growth temperature in prokaryotes. J Mol Evol 44: 632-636.
 - **GOMRI M.A. (2011).** Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermales terrestres de l'Est algérien. mémoire de Magister spécialité Sciences Alimentaires, université mentouri-constantine, 81p.

- **GORDONR E., HAYNESW C. & PANG C.H.N. (1973).** The Genus *Bacillus* (Agricultural Handbook). Washington DC: United States Department of Agriculture. n° 427.
- **GOUNOT A. M. (1997).** Microorganismes autochtones des milieux aquatiques : Exemples d'adaptations aux conditions extrêmes. Journal L'Eurobiologiste ISSN 0999-5749. n°230, pp. 59-65.
- **GREGOIRE P., FARDEAU ML., GUASCO S., BOUANANE A., MICHOTEY V., BONIN P., DUBOURG K., CAMBAR J., & OLLIVIER B. (2009).** Les microorganismes de l'extrême. Press. Therm. Climat., 146:49-61.
- **HARLEY J.P., PRESCOTT L.M. (2002).** Laboratory Exercises in Microbiology, 5th Ed., 449 P.
- **HEZIL A. (2013).** Analyses physico-chimique des vapeurs d'eau thermale de hammame K'nif. Mémoire de master. Département d'Ecologie et Environnement. Université de Khenchela. 60 p.
- **HOLDEN J.F. (2009).** Extremophiles: Hot Environments in Encyclopedia of microbiology, 3rd Ed., Schaechter M. P: 127-146.
- **HURST LD. & MERCHANT AR.** High guanine-cytosine content is not an adaptation to high temperature: a comparative analysis amongst prokaryotes Proc Biol Sci 2001; 268: 493-497.
- **ISSAADI, A. (1992).** Le Thermalisme dans son cadre géostructural, Thèse de doctorat. hydrogéologie. Université d'Algérie, 268 p.
- **JAENICKE R. & STERNER R. (2006).** Life at high temperatures in: The prokaryotes. Ed. Dworkin M. 2:167–209 p. Springer, Singapore
- **JEAN P. & VANDECASTEELE (1991).** Microbiologie pétrolière concepts, implications environnementales, pp 17.
- **JOFFIN J.N. & LEYRAL G. (2006).** Microbiologie technique, tome 1 : dictionnaire des techniques 4^{ème}s éditions. 361P.
- **KANAI T., ITO S. & IMANAKA T. (2003).** Characterization of a cytosolic NiFehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. J. Bacteriol., 185:1705-11 p.

- **KONINGS W.N., ALBERS S.V., KONING S. & DRIESSEN A.J. (2002).** The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and Archaea in extreme environments. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 81: 61-72 p.
- **LANSING M. P., JOHN P. H., DONALD A. K., CLAIRE M. B.C. & JEAN D. (1994).** *Microbiologie*, 463-1164 p.
- **LLOYD, J., LOVELEY D. R. & MACASKIE E. L. (2003).** Biotechnological application of metal-reducing microorganisms. *Adv. Appl. Microbio.*, 53: 85-128 p.
- **MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., STAHL D.A. & CLARK D.P. (2010).** *Brock's biology of microorganisms*, 13th ed., 18:577-780 p. Pearson.
- **MARCHANT R. & BANAT I.M. (2010).** The genus *Geobacillus* and hydrocarbon utilization in: *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Timmis K.N., P:1888-1894. Springer
- **MATHIS B. J., MARSHALL C. W., MILLIKEN C. E., MAKKAR R. S., CREAGER S. E. & MAY H. D. (2008).** Electricity generation by thermophilic microorganisms from marine sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78:(1):147-155 p.
- **NAWANI, N., & KAUR J. (2000).** Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Molecular and Cellular Biochemistry*. Vol. 206, no. 1-2, p. 91-96.
- **NORRIS P., BURTON N. & FOULIS N. (2000).** Acidophiles in bioreactor mineral processing. *Extremophiles*; 4:71-76 p.
- **OSHIMA T., & MORIYA T. (2008).** A preliminary analysis of microbial and biochemical properties of high-temperature compost. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1125:338-344.
- **OUALI S. (2008).** Les sources Thermales en Algérie, Division Energie Solaire Thermique et Géothermie, *Revue des Energies Renouvelables SMSTS'08* Alger, 229 – 236 p.
- **PHIPPS B.M., HOFFMANN A., STETTER K.O. & BAUMEEISTER W. (1991).** A novel ATPase complex selectively accumulated upon heat shock is a major cellular component of thermophilic archaeobacteria. *Embo J* 10: 1711-1722.

- **PIERRE (2001).** H₂O Magazine. www.h2o.net/sante-thermalisme-et-thalassotherapie/eaux-thermales.htm .Mai 2017- 16:30.
- **PRIEST G.F., FERGUS G., GOODFELLOW M. & TODD C. (1988).** A Numerical Classification of the genus *Bacillus*. J. of general microbiol., 134:1847-1882.
- **PRIEST G.F., FERGUS G., GOODFELLOW M. & TODD C. (1988).** A Numerical Classification of the genus *Bacillus*. J. of general microbiol., 134:1847-1882.
- **QUÉRELLOU J., & GUÉZENNEC J. (2010).** Biotechnologie des extrêmophiles. Editions Tech. Ing. BIO580; P : 1-13.
- **REDDY T.R., & SURYANARAYANA T. (1989).** Archaeobacterial histone-like proteins.
- **SANDMAN K. & REEVE, J.N.(2005).** Archaeal chromatin proteins: different structures but common function? *Current opinion in microbiology*, vol. 8, no 6, p. 656-661.
- **SCHLEIFER, K. & KANDLER, O. (1972).** Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews*, vol. 36, no 4, p. 407.
- **SCHMIDT D., C., M. L. RUA, S. WAHL & R. D. SCHMID. (1997).** *Bacillus thermocatenulatus* lipase : a thermoalkalophilic lipase with interesting properties. **Biochemical Society Transactions**. vol. 25, no. 1, p. 178-182
- **SEGUENI S., KAPTANE N.E , & BOUROUBA L. (2007)** .Evaluation de la communauté bactérienne thermophile de la source de Hammame Es Salhine, mémoire d'Ingénieur, spécialité Génétique Cellulaire et Moléculaire Appliquée, Universitaire de Khenchela , 46p..
- **SINGER, G. A. & HICKEY, D. A. (2003)** Thermophilic prokaryotes have characteristic patterns of codon usage, amino acid composition and nucleotide content. *Gene*, vol. 317, p. 39-47.
- **SURUCU G. (1999).** Growth requirements of thermophilic aerobic microorganisms in mixed cultures for the treatment of strong wastes. *Water science and technology*. Vol 40, no.1, p.53-60.
- **TRIVEDI S., GEHLOT H.S. & RAO S.R. (2006).** Protein thermostability in archaea and eubacteria. *Genet. Mol. Res.*, 5: 816-827.

- **VITTORIO F. R., OTTO R., (2000).** Vademecum clinique du diagnostic au traitement, 16 ième Ed .924-2047 p.
- **VUATAZ F.D. (1982).** Hydrogéologie, géochimie et géothermie des eaux thermales de Suisse et des régions alpines limitrophes. Matériaux pour l'hydrologie, n°29. Kummerly & Frey Geographischer Verlag, Berne. 149 p.
- **WILHELM N. (1998).** Botanique générale. De Boeck Supérieur ,494-624p.
- **WOODWARD J. (1735),** Géographie physique : ou, Essay sur l'histoire naturelle de la terre. Chez Briasson, 389 pages.
- **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.
- **ZAVODSKY P., KARDOS J., SVINGOR, & PETSKO G.A. (1998).** Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins. Proc Natl Acad Sci USA 95: 7406-7411.
- **ZEMOUR Y. (2016).** Eau souterraine et environnement. Mémoire de Master 2 Eau souterraine et environnement, Faculté des sciences de la terre et de l'univers. Université de Mohamed Ben Ahmed Oran 2, 46 p.

Annexe 01**Milieux utilisés pour l'isolement et la purification des souches****Milieu 01**

Composition	Concentration (g/l)
NaCl	2
Extrait de levure	4
Peptone	8
Agar	20
1l d'eau distillée	

Milieu 02

Composition	Concentration (g/l)
Amidon soluble	1
Extrait de levure	1
Peptone	5
Agar	20
1 litre d'eau distillée.	

Milieu 03

Composition	Concentration (g/l)
NaCl	5
Extrait de levure	2,5
Peptone	5
Extrait de viande	1
Agar	20
1 litre d'eau distillée.	

Milieu 04

Composition	Concentration (g/l)
NaNO ₃	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
KCl	0,50
Fe ₂ (SO ₄), 3H ₂ O	0,01
KH ₂ PO ₄	0,14
K ₂ HPO ₄	1,20
Extrait de levure	0,02

Agar	20
------	----

1 litre d'eau distillée.

Milieu 05 (G N)

Concentration (g/l)

Extrait de viande	1,0
-------------------	-----

Extrait de levure	2,5
-------------------	-----

Peptone	5,0
---------	-----

Chlorure de sodium	5,0
--------------------	-----

Agar	15,0
------	------

Milieus de culture utilisés pour la recherche des activités hydrolytiques extracellulaires

Milieu 01 (Recherche de l'amylase)

Composition

Concentration (g/100ml)

NaCl	0,2
------	-----

Amidon soluble	1
----------------	---

Extrait de levure	0,2
-------------------	-----

Peptone	0,5
---------	-----

Agar	3,0
------	-----

100 ml d'eau distillée.

Milieu 02 (Activités lipolytiques)

Milieu 02(a)

Composition

Concentration (g/100ml)

NaCl	0,2
------	-----

Extrait de levure	0,1
-------------------	-----

Peptone	0,2
---------	-----

Agar	3,0
------	-----

1 ml de Tween 20

100 ml d'eau distillée.

Milieu 02 (b)

Composition

Concentration (g/100ml)

NaCl	0,2
------	-----

Extrait de levure	0,1
-------------------	-----

Peptone	0,2
---------	-----

Agar	3
------	---

1ml de Tween 80

100 ml d'eau distillée.

Milieu 03 (Activité protéolytique)**Milieu 03 (a)**

Composition	Concentration (g/100ml)
Nacl	0,2
Caséine	1
Extrait de levure	0,2
Peptone	0,2
Agar	3

100 ml d'eau distillée

Milieu 03 (b)

Composition	Concentration (g/100ml)
NaCl	0,2
Gélatine	0,4
Extrait de levure	0,2
Peptone	0,2
Agar	3

100 ml d'eau distillée

Milieu Clark et Lubs

Composition	Concentration (g/100ml)
K ₂ HPO ₄	0,5
Glucose	0,5
Peptone	0,5

100 ml d'eau distillée.

Réalisation de la coloration de Gram

Réactifs

- Violet de gentiane phénique
- Lugol (iodo-iodure de potassium)
- Alcool à 95% (ou mélange alcool absolu+ 1/5ème d'acétone)
- Safranine (ou Fuchsine phéniquée de ziehl)
- Préparer un frottis d'un produit pathologique ou d'une culture bactérienne pure ;
- Recouvrir le frottis de **violet-cristal oxalaté** ; laisser agir 1 minute ; rincer a l'eau distillée ;
- Verser du **lugol** et le laisser agir pendant 1 minute ; rincer a l'eau distillée ;
- Décolorer a l'**alcool à 95C⁰**, entre 15 et 30 secondes (selon les auteurs) ; -rincer a l'eau distillée ;
- Recolorer avec de la **safranine** pendant 10 à 30 secondes ; rincer à l'eau distillée ;
- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec bunsen ;
- Observer à l'objectif à immersion.

Les bactéries « **Gram-positif** » apparaissent en **violet foncé**, les bactéries « **Gram-négatif** » en **rose ou rouge**.

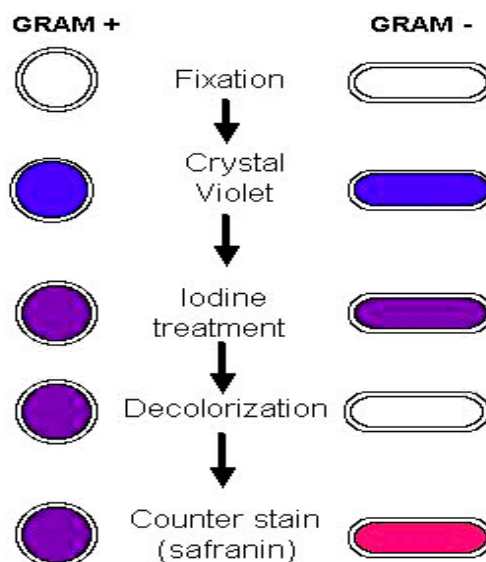


Figure 01 : Coloration de Gram.

Résumé

Ce travail a permis de mettre en évidence la population bactérienne thermophile d'une source thermale de l'Est Algérien, Hammam El Salhine -Khenchela-, qui sont des organismes unicellulaires capables de vivre dans des températures comprises entre 45°C et 70 °.

L'isolement et la purification de ces microorganismes sur des milieux spécifique à des températures de 55°C ont permis la détermination de 11 souches appartient à sept genres : *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Caldimonas*, *Laceyella*, *Caldibacillus*, *Kroppenstedtia* et *Thermobacillus*. Parmi ces dernières, plus de 70% ont montré des activités biochimiques hydrolytiques extracellulaires ; amylolytique, protéolytiques et lipolytiques. Ces souches ont également montré une bonne tolérance des températures élevées allant jusqu'à 70°C ce qui ouvre des perspectives pour des applications dans le domaine industriel.

Mots clés : Bactéries thermophiles, Isolement, Identification, source thermale, Hammam El-Salhine, Activités hydrolytiques

Abstract

This work demonstrated the thermophilic bacterial population living in a thermal spring in the East of Algeria, exactly in Hammam El Salhine -Khenchela-which are unicellular organisms able to live between 45 ° C and 70 ° C.

The isolation and purification of these microorganisms in specific media at 55 ° C has allowed the determination of 11 strains that belong to seven genus: *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Caldimonas*, *Laceyella*, *Caldibacillus*, *Kroppenstedtia* and *Thermobacillus*. More of 70% of them showed extracellular activities hydrolytic; amylolytic, proteolytic and lipolytic. These strains have also showed good tolerance to high temperatures up to 70 ° C, which opens prospects for applications in the industrial field.

Key words: Thermophilic bacterias, Isolation, Identification, Thermal spring, Hammam El-Salhine, Hydrolytic activities

ملخص

يمكننا هذا العمل من تسليط الضوء على المجتمع البكتيري الاليف للحرارة لمنبع حراري حمام الصالحين بالشرق الجزائري -خنشلة-. وهي كائنات مجهرية وحيدة الخلية قادرة على العيش في درجات حرارة تتراوح بين 45 و70 درجة مئوية.

عزل وتنقية هذه الكائنات المجهرية في أوساط محددة تحت درجة حرارة 55 درجة مئوية يسمح بتحديد 11 سلالة ينتمون إلى سبع أجناس: *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Caldimonas*, *Laceyella*, *Caldibacillus*, *Kroppenstedtia* و *Thermobacillus*. من بين هذه الأخيرة، أكثر من 70% أظهرت أنشطة بيوكيميائية حلمية خارج الخلية؛ محلل النشا، محلل بروتين و محلل الشحميات. وأظهرت هذه السلالات أيضا تحمل لدرجات الحرارة العالية التي تصل إلى 70 درجة مئوية مما يفتح آفاقا للتطبيقات في المجال الصناعي.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا أليف للحرارة، عزل، تحديد، منبع حراري، حمام الصالحين، الأنشطة الحلمية.