

Popular Democratic Republic of Algeria
Ministry of High Education and Scientific
Research
Abbes Laghrou University- Khenchela-
Natural and life sciences Faculty
Molecular and Cellular Biology Department
N° de série:



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES DE MASTER ACADEMIQUE

Domaine : **Sciences de la nature et de la vie**

Filière : **Sciences Biologiques**

Spécialité : **Microbiologie Appliquée**

Présenté par :

Aya ARAB

Aridj ARAB

Thème

**Criblage des activités enzymatiques et
antimicrobiennes de la flore aérobie sporulée
inféodée aux sources thermales de région de
Khenchela**

Mémoire soutenu publiquement le 15/06/ 2025 Devant le jury composé de :

Dr Lilia DOUAOUYA

MCA, Université de Khenchela, Président

Dr Zakaria BOUTARFI

MCB, Université de Khenchela, Encadrant

Dr Kelthoum CHORFI

MCB, Université de Khenchela, Examineur

Année Universitaire 2024/2025

Remerciements

Louange à Dieu qui nous a guidés et nous a donné la force et la volonté d'accomplir ce travail modeste.

Nous exprimons notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre honorable encadrant, le Dr Zakaria BOUTARFI, pour ses précieux conseils, ses critiques constructives, sa compréhension et son soutien continu tout au long de la réalisation de ce travail. Nous lui témoignons tout notre respect et notre reconnaissance.

Nous adressons également nos remerciements les plus sincères aux membres du jury

Le Dr Lilia DOUAOUYA, pour nous avoir honorés en présidant le jury d'évaluation de ce mémoire, et le Dr Kelthoum CHORFI, pour avoir accepté de discuter ce travail et pour ses remarques précieuses.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à l'équipe technique du Département de la Haute technologie pour son accueil chaleureux, son aide précieuse et sa disponibilité tout au long de notre travail, en particulier à l'ingénieur du laboratoire de microbiologie, Mme S.

MIZAN

Nous exprimons également notre profonde gratitude à M. Cherif MAANSRI, Chef du service de traitement des eaux a Kais, ainsi qu'à Mme S. MAANSRI, pour leur soutien généreux et leur précieuse assistance, qui ont grandement facilité la réalisation de ce travail.

Nous tenons aussi à remercier chaleureusement l'équipe de l'Algérienne des Eaux, en particulier Mme A. BENZAÏM, pour sa collaboration efficace et son accueil chaleureux.

Enfin, nous tenons à remercier tous nos enseignants de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et tous nos amis et collègues, en particulier la promotion 2025, à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Nous remercions Dieu Tout-Puissant de nous avoir donné la force et la persévérance pour accomplir ce parcours.

Avec toute notre gratitude et notre amour,

Nous dédions le fruit de ce travail modeste à ceux qui ont été notre soutien et notre motivation tout au long de notre parcours :

À notre cher défunt père **Ismail**, que Dieu lui fasse miséricorde et l'accueille dans Son vaste paradis,

Lui qui a semé dans nos cœurs la patience et le goût de l'effort.

Et à notre chère mère **Malika**, que Dieu lui accorde une longue vie et la protège de tout mal,

Elle qui a toujours été, et reste encore, une source inépuisable de tendresse et de prières.

C'est à vous deux, après Dieu, que revient le mérite de ce que nous avons pu accomplir aujourd'hui.

À nos chères sœurs **Afaf, Zahia et Nassira**,

Et à nos chers frères **Haroun, Lazhar, Mahmoud, Bouzid et Fouaz**, Notre pilier dans la vie,

Nous vous adressons tout notre amour et notre profonde gratitude.

Grâce à votre soutien et vos encouragements, ce parcours a porté ses fruits.

A nos chères amies **Zakia, Chaima, Ikram, Marwa, Linda, Salma, Asma, Chaima, Karawane, Dhawya, Ghalia et Farida**

Chères compagnes de route, merci pour votre soutien et votre aide.

A tous les étudiants de microbiologie promotion 2024/2025.

Et je n'oublie pas d'adresser mes sincères remerciements à ma chère **jumelle** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce travail et de notre parcours d'études. Sans sa présence à mes côtés, ce chemin n'aurait pas été aussi serein et solide.

Aya et Aridj

Table des matières

PAGE

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des Abréviations

Liste des figures

Liste des photographes

Liste des tableaux

Introduction générale

01

Matériel et Méthodes

03

1-Echantillonnage

03

1.1-Présentation de site de prélèvement

03

1.1.1-Site Hammam Essalihine

03

1.1.2-Site Hammam El knif

03

1.1.3-Site Hammam Tamersit

04

2-Prélèvement

04

3- Étude physique et chimique d'échantillons

05

3.1-Méthodes électrochimiques

05

3.1.1-PH et Température

05

3.1.2-La conductivité

05

3.1.3-La turbidité

06

3.2-Méthodes spectrophotométriques

06

3.2.1-Dosage d'ammonium

06

3.2.2-Dosage des nitrites

07

3.2.3- Dosage des nitrates

07

3.2.4-Dosage de sulfate	08
3.2.5-Dosage de ortho phosphates	08
3.2.6-Dosage de fer	08
3. 3-Méthodes volumétriques	09
3.3.1- Dosage des ions bicarbonate	09
3.3.2- Dosage du calcium	10
3.3.3- Dosage des ions chlorure	10
3.3.4- Titre alcalimétrique total (TAC)	11
3.3.5-Dureté totale TH	11
3.3.6-Dosage de Magnésium Mg	11
3.3.7- Titre alcalimétrique (TA)	12
3.3.8-Matière Organique	12
3.4-Méthodes Spectrophotomètre à flamme	13
3.4.1-Dosage des ions sodium	13
3.4.2- dosage des ions potassium	13
4-Etude bactériologique d'échantillons	14
4.1- Traitement thermique	14
4.2- Enrichissement	14
4.3- Isolement et purification	14
5- Identification	14
5.1- Eude des caractères phénotypiques des isolats	14
5.1.1- Caractères macroscopiques	14
5.1.2- Caractères microscopiques	15
5.1.2.1- Coloration de Gram	15
5.1.2.2- Coloration de vert de malachite	15
5.1.3- Caractères biochimiques	16
5.1.3.1- Recherche du type respiratoire	16

5.1.3.2- Recherche de catalase	16
5.1.3.3- Recherche de l'oxydase	17
5.1.3.4- Recherche de ONPG (Orthonitro-Phenyle -B-Galactoside)	17
6- Recherche de la production des activités enzymatiques	17
6.1- Sur milieu gélosé	17
6.1.1- Recherche de l'activité protéasiques	18
6.1.1.1- Hydrolyse de la gélatine	18
6.1.1.2- Hydrolyse de la caséine	18
6.1.2- Recherche de l'activité amylolytique	18
6.1.3-Recherche des activités estérasiques	18
6.1.3.1- Hydrolyse du Tween 80	18
6.1.3.2- Recherche de lécithinase	19
6.1.4-Recherche de l'activité cellulosique	19
6.1.5 -Recherche de l'activité xylanolytique	19
6.1.6 -Recherche de l'activité Esculinase	19
6.1.7 -Recherche de l'activité hémolytique	19
6.2- Évaluation de l'activité enzymatique du surnageant	20
6.2.1- Évaluation de la thermo stabilité du surnageant	21
7-Criblage des activités antimicrobiennes des isolats	21
7.1- Extraction des métabolites secondaires	21
7.2-Teste de l'activité antimicrobienne	22
Résultats et discussion	23
1-1-Paramètres physico-chimiques	23
2- Étude bactériologique d'échantillons	27
3- Recherche de la production des activités enzymatiques	28
3.1- Sur milieu gélosé	28
3.2- Évaluation de la thermostabilité du surnageant (milieu liquide)	32

4-Criblage des activités antimicrobiennes des isolats	33
Conclusion et perspectives	34
Les références Bibliographiques	35
Annexes	

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد خصائص الفلورا الهوائية المكونة للأبواغ والمعزولة من الينابيع الحموية بمنطقة خنشلة، وذلك بغرض تقييم إمكاناتها الإنزيمية والمضادة للميكروبات. تم تحليل الخصائص الفيزيائية والكيميائية لمياه الينابيع الحموية في حمام الصالحين، حمام الكنيف، وحمام تمرسط، حيث أظهرت النتائج وجود تشابه في بعض الخصائص مثل درجة الحموضة (pH)، إلى جانب وجود اختلافات واضحة بين هذه المواقع. أدى تحليل الخصائص الظاهرية إلى التعرف على تسعة عزلات بكتيرية تنتمي إلى جنس *Bacillus* وهي عبارة عن عصيات إيجابية الغرام، صارمة التهوية (تحتاج إلى الأوكسجين) خضعت هذه السلالات لاحقاً لعملية فحص إنزيمي لتقييم قدرتها على إنتاج عدد من الإنزيمات، مثل: الأميلاز، البروتياز، الجيلاتيناز، الليسيثيناز، الإستيراز، السيلولاز، الزايلاناز، الإسكوليناز، بالإضافة إلى الهيموليسين من النوع ألفا (α) وبيتا (β) أظهرت معظم العزلات نشاطات تحللية (هيدروليتيكية) ملحوظة، باستثناء إنزيمي الزايلاناز والأميلاز، حيث كان تعبيرهما ضعيفاً. وبناءً على تنوع أنماطها الإنزيمية، تم اختيار خمس سلالات لإجراء اختبارات في مزرعة سائلة. أظهرت دراسة الاستقرار الحراري لإنزيماتها أن النشاط الإنزيمي يكون أمثل عند درجة حرارة 37°C ، ويقل بشكل واضح عند 50°C ، ويكاد يندم عند 90°C ، باستثناء الزايلاناز الذي زاد نشاطه عند درجات الحرارة المرتفعة. لم تُلاحظ أي نشاطات مضادة للميكروبات لدى العزلات المختبرة. تُبرز هذه النتائج ثراء وتنوع الميكروفلورا الحموية في منطقة خنشلة، وما تحمله من إمكانات واعدة في المجال البيوتكنولوجي، خاصةً في التطبيقات الصناعية والصيدلانية.

الكلمات المفتاحية: *Bacillus*، محبة للحرارة، النشاط الإنزيمي، الينابيع الحموية لمنطقة خنشلة.

Abstract

The present study aims to characterize the aerobic spore-forming flora isolated from the thermal springs of the Khenchela region, in order to evaluate its enzymatic and antimicrobial potential. The physicochemical properties of the thermal waters from Hammam Essalihine, Hammam El-Knif, and Hammam Tamersit were analyzed, revealing both similarities, such as pH, and notable differences between these sites. Phenotypic analysis enabled the identification of nine bacterial isolates belonging to the genus *Bacillus*. These bacteria are Gram-positive bacilli and strictly aerobic. The isolated strains were subjected to enzymatic screening to assess their ability to produce various enzymes: amylases, proteases, gelatinase, lecithinase, esterase, cellulase, xylanase, esculinase, as well as alpha (α) and beta (β) hemolysins. Most of the isolates exhibited significant hydrolytic activities, except for xylanase and amylase, whose expression remained low. Based on the diversity of their enzymatic profiles, five strains were selected for further testing in liquid culture. Thermal stability analysis of their enzymes revealed optimal activity at 37 °C, a marked decrease at 50 °C, and near-complete inactivation at 90 °C, with the exception of xylanase, whose activity increased at high temperatures. No antimicrobial activity was observed in the tested isolates. These results highlight the richness, diversity, and promising biotechnological potential of the thermal microflora in the Khenchela region, particularly for industrial and pharmaceutical applications.

Keywords: *Bacillus*, thermophiles, enzymatic activity, thermal springs of the Khenchela region.

Résumé

La présente étude a pour objectif de caractériser la flore aérobie sporulée isolée à partir des sources thermales de la région de Khenchela, en vue d'évaluer son potentiel enzymatique et antimicrobien. Les propriétés physico-chimiques des eaux thermales de Hammam Essalihine, Hammam El-Knif et Hammam Tamersit ont été analysées, révélant à la fois des similitudes comme le pH et des différences notables entre ces sites. L'analyse des caractéristiques phénotypiques a permis d'identifier neuf isolats bactériens appartenant au genre *Bacillus*. Ces bactéries sont des bacilles à Gram positif, strictement aérobies. Ces souches ont ensuite été soumises à un criblage enzymatique afin d'évaluer leur capacité à produire différentes enzymes : amylases, protéases, gélatinase, lécithinase, estérase, cellulase, xylanase, esculinase, ainsi que des hémolysines de types alpha (α) et bêta (β). La majorité des isolats ont présenté des activités hydrolytiques significatives, à l'exception de la xylanase et de l'amylase, dont l'expression est demeurée faible. Sur la base de la diversité de leurs profils enzymatiques, cinq souches ont été sélectionnées pour des essais en culture liquide. L'étude de la stabilité thermique de leurs enzymes a révélé une activité optimale à 37 °C, une baisse marquée à 50 °C, et une quasi-inactivation à 90 °C, à l'exception de la xylanase, dont l'activité a augmenté à haute température. Aucune activité antimicrobienne n'a été observée chez les isolats testés. Ces résultats mettent en lumière la richesse, la diversité et le potentiel biotechnologique prometteur de la microflore thermique de la région de Khenchela, notamment pour des applications industrielles et pharmaceutiques.

Mots clés : *Bacillus*, thermophiles, activité enzymatique, source thermales de région de Khenchela.

Liste des Abréviations

ABREVIATION	MOT COMPLET
ADE	Algérienne des eaux
Ag NO ₃	Nitrate d'argent
ATCC	American Type Culture Collection
BN	Bouillon Nutritif
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid disodium
GN	Gélose Nutritive
H ₂ SO ₄	L'acide sulfurique
HK	Hammam El knif
HS	Hammam Essalihine
HSN	Murexide
HT	Hammam Tamersit
K10	Réactif tampon PH 10
MnSO ₄	Sulfate de manganèse
NaOH	Hydroxyde de sodium
NCIMB	National Collection of Industrial Food Marine Bacteria
NCTC	National Collection of Type Cultures
NET	Réactif Noir Eriochrome
ONPG	Orthonitro-Phenyle -B-Galactoside
TA	Titre alcalimétrique
TAC	Titre alcalimétrique total
TH	Dureté totale
VF	Milieu Viande-Foie

Liste des figures

FIGURE	TITRE	PAGE
01	Site d'échantillonnage Hammam Essalihine.	03
02	Site d'échantillonnage Hammam El knif.	04
03	Site d'échantillonnage Hammam Tamersit.	04
04	Les étapes de coloration de vert de malachite «méthode de schaeffer-fulton».	16
05	Test de la catalase.	17
06	Cercle relatif indiquant la proportion d'isolats dans chaque lieu d'échantillonnage.	28
07	Cercles relatifs montrant l'activité enzymatique dans les souches.	30
08	Activité enzymatique des isolats bactériens sur différents substrats.	31
09	Variation de l'activité des enzymes hydrolytiques en fonction de la température chez les souches étudiées.	32

Liste des photographies

PHOTOGRAPHIE	TITRE	PAGE
01	Appareil de Mesure la conductivité (multi paramètre)	05
02	Appareil de Mesure la turbidité (Turbidimètre)	06
03	Appareil d'un spectrophotomètre	09
04	Appareil de Mesure potassium et sodium (spectrophotomètre à flamme).	14
05	Phtoto de Centrifugeuse (10 000 rpm pendant 15 minutes).	20
06	Photo montrant la technique des puits	20
07	Appareil de rotavap pour récupération d'extrait d'échantillon.	21
08	La température de Hamman Tamersit.	25
09	Exemple d'observation au microscope photonique (x100). Coloration de Gram des isolats	28
10	Exemples des résultats de l'activité enzymatique A: Hémolytique, B: Esculinase, C: Lécithinase et D: Esterase	29
11	Résultats d'activités antimicrobiennes des isolats	33

Liste des tableaux

LE TABLEAU	TITRE	PAGE
01	Résultats de l'analyse physico-chimique d'échantillons.	24
02	Le nombre des isolats dans chaque lieu d'échantillonnage.	27

Introduction

Le globe terrestre héberge une multitude d'écosystèmes hautement variés, qui se distinguent par la divergence dans leurs caractéristiques physico-chimiques, parmi eux s'installe les sources thermales comme étant des écosystèmes extrêmes (**Rothschild et Mancinelli, 2001; Cavicchioli et al., 2011**) qui sont définies comme toutes sources naturelle d'eaux dont la température dépasse celle de l'environnement agatisent(**Pentecost et al.,2003**). L'Algérie recense plus de 240 sources thermales dont la plus chaude est à 98°C situé à Hammam Debbagh dans la région de Guelma (**Saibi ,2009**).

Ces sources sont exploitées pour leurs avantages, en particulier dans un cadre thérapeutique. Toutefois, elles sont peu examinées sous l'angle de la biodiversité microbienne et ce n'est que dans les deux dernière décennies qu'on a commencé à s'intéresser aux microorganismes qui résident dans ces milieux (**Arab et al., 2018**). Ces organismes dites « thermophiles » à cause de leurs pouvoir adaptations exceptionnelles qui les aident à perdurer et à se proliférer dans des environnements à haute température (**Adiguzel et al., 2009**). Le terme thermophiles a été introduit la première fois par **Miquel (1879)** pour désigner les microorganismes dans la température optimale de croissance dépasse 60°C.

Actuellement un consensus est installé dans la communauté scientifique pour définir bactéries thermophiles comme étant toutes bactéries dans la température optimale de croissances dépasse 40 °C avec trois sous catégories qui sont les thermophiles modérés, les thermophiles extrêmes et les hyper thermophiles (**Mehta et Satyanarayana ,2013**). Ces écosystèmes hébergent entre autres les *Archaea*, Les bactéries sulfo-oxydantes, les bactéries sulfatoréductrices, et les méthanogènes (**Minic et al., 2006**). On trouve parmi les microorganismes qualifiés d'extrêmophiles, Les bactéries Gram positives aérobies sporulées thermophiles dont les bactéries appartenant au genre *Bacillus*. Ces dernière sont classées en deux catégories : les thermophiles obligatoires et les thermophiles facultatifs aussi appelés microorganismes thermotolérants (**Crabb et al., 1974; Flint et al., 2001**).

Les membres du genre *Bacillus* appartiennent à la famille des *Bacillaceae*, l'ordre des *Bacillales* et la classe des *Bacilli* rassemblent le genre *Bacillus*, qui fait également partie du phylum des *Firmicutes*. Ce genre a un rôle significatif dans l'histoire de la bactériologie (**Paul Vos et al., 2011**). Ces bactéries se caractérisent par leur forme bâtonnet, avec des extrémités carrées ou arrondies, de taille variée pouvant aller de 0,5 à 1,2 µm de diamètre et jusqu'à 2,5 à 10 µm de longueur, ces germes se présentent généralement sous forme droite ou légèrement courbée et peuvent être observées isolément, par paires, en chaînes, et parfois

même sous la forme de longs filaments. Elles se caractérisent par leur pouvoir de sporulation, leur conférant une grande résistance face à diverses conditions adverses (**Paul Vos et al., 2011**).

Les *Bacillus* thermophiles peuvent être exploitées biotechnologie en vue de leur capacité de produire des enzymes thermostable, avec plusieurs applications industrielles possibles (**Brock, 2001**), elles ont notamment contribué à plusieurs avancés biotechnologiques dans la production d'acides nucléiques et d'acides aminés, ainsi que dans l'étude des structures protéiques (**Antranikian, 2008**). Par ailleurs, plusieurs auteurs ont démontré le pouvoir antagoniste des souches thermophiles via à la production des métabolites secondaires à activité antimicrobienne, tels que des peptides antibactériens ou des bactériocines, ce qui les rendent potentiellement exploitables en domaine pharmaceutique ou en biocontrôle (**Aissaoui et al., 2021; Olanrewaju et Babalola, 2021; Pardo-Esté et al., 2024**).

Le présent travail s'intéresse à la recherche de bacilles à Gram positif thermophiles dans les sources thermales de région de Khenchela et exploitent leur potentielle biotechnologique sous diverses ongles notamment la production d'enzymes d'intérêt ainsi que leur possible activité antimicrobienne. Ce criblage permettra probablement la valorisation de la diversité microbienne autochtone et spécifique à la région de Khenchela.

Matériel et méthodes

1-Echantillonnage :

1.1-Présentation des sites d'échantillonnage

1.1.1-Hammam Essalihine

Située dans la commune d'El Hamma, à 7 km au nord-ouest de la région de Khenchela, au sud du bassin de Remila, dans une dépression montagneuse, couvrant la zone géographiquement limitée par les coordonnées géographiques 35°26 '20.12« N et 7° 05 08.46 » E de longitude (**figure 01**) (Houha, 1996).



Figure 01 : Site d'échantillonnage Hammam Essalihine (Google Earth, 2025).

1.1.2-Hammam El knif :

Située à 15 km au nord-est de la région de Khenchela dans la commune de Baghai, elle couvre la zone délimitée géographiquement par les coordonnées géographiques 35° 29 11,63« N et 7° 15 08,64 » E (**figure 02**) (Houha, 1996).



Figure 02: Site d'échantillonnage Hammam El knif (Google Earth, 2025).

1.1.3-Hammam Tamersit :

C'est une source située, au sud de Khenchela, à environ 4 kilomètres de la commune de Khiran, couvrant la zone géographiquement limitée par les coordonnées géographiques $34^{\circ}59'55''\text{N } 6^{\circ}45'38''\text{E}$ (figure 03).



Figure 03: Site d'échantillonnage Hammam Tamersit (Google Earth, 2025).

2-Prélèvement :

Le prélèvement a été effectué dans des flacons stériles sur une profondeur 20 cm afin d'éviter la contamination par les bactéries de l'air, par la suite les échantillons ont été transportés au laboratoire dans des bacs isothermes dans un intervalle de temps inférieur à 2 h pour de futures analyses.

3- Étude physico-chimique d'échantillons :

Étude physico-chimique a été effectuée au niveau du laboratoire de contrôle de qualité d'eau de l'entreprise ADE.

3.1-Méthode électrochimique

3.1.1-PH et Température

La température et le pH, ont été relevés à l'aide d'un thermomètre et pH mètre.

3.1.2-La conductivité

La conductivité électrique représente une mesure du courant transporté par les ions dissous dans l'eau, elle est influencée par : la concentration ionique, la nature des ions, la température et la viscosité de la solution, ce paramètre a été mesuré l'aide d'un multi paramètre de type HACH® SL1000 (**Photographie 01**) (ISO N° 7888).



Photographie 01 : Appareil de Mesure la conductivité (multi paramètre).

3.1.3-La turbidité

3.1.3.1-Principe

La turbidité mesure la présence de substances en suspension dans l'eau, variant en fonction du type de capteur, de la forme, de la taille, de la composition et de la quantité de particules solides, affectant la lumière (Fallou, 2024).

3.1.3.2-Mode opératoire

L'échantillon doit être homogénéisé avant la mesure et est mesuré à l'aide d'un Appareil de type HACH® TL2300 (Photographie 02) (ISO 7027).



Photographie 02: Appareil de Mesure la turbidité (Turbidimètre).

3.2-Méthode spectrophotométrique

Toutes les mesures de densité optique ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre d'un type LANGE® DR3900 (Photographie 03).

3.2.1-Dosage d'ammonium

3.2.1.1-Principe

La mesure de l'ammonium dissous dans l'eau repose sur la quantification par le spectrophotomètre à une longueur d'onde 655 nm de la couleur bleue produite par la réaction de l'ammonium avec les ions salicylates et hypochlorites en présence de nitroprussiate de sodium est mesuré par spectrométrie. Les ions hypochlorites sont produits sur place grâce à

l'hydrolyse alcaline du sel de sodium du dichloroisocyanurate de sodium (**Norme ISO 7150/1**).

3.2.1.2-Mode opératoire

Brièvement, 4 ml de réactif 1 (**annexe1**) et 4 ml de réactif 2 (**annexe1**), ont été mélangés à 40 ml de l'échantillon à analyser et ont été prélevés, Puis le mélange a été incubé pendant une heure à température ambiante (**Norme ISO 7150/1**).

3.2.2- Dosage des nitrites

3.2.2.1-Principe

Les ions de nitrite réagissent avec le dichlor-hydrate de N-(naphtyl-1) diamino-1,2 éthane et l' amino-4 benzène sulfonamide en présence d'acide orthophosphorique, pour former un sel diazoïque, un composé de couleur rose dans l'intensité est évalué par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 540 nm(**La norme ISO 6777**).

3.2.2.2-Mode opératoire

Dans un premier temps, mélanger : 1 ml de réactif coloré (**annexe 1**) avec 40 ml d'eau à analyser, puis porter à 50 ml. Le pH à ce stade doit être de 1,9. La solution est ensuite laissée au repos pendant au moins 20 minutes avant d'être mesurée (**La norme ISO 6777**).

3.2.3- Dosage des nitrates

3.2.3.1-Principe

En présence de salicylate de sodium, le nitrate se transforme en paranitrosalicylate de sodium, qui est de couleur jaune et peut être mesuré par colorimétrie (**Rodier, 2009**).

3.2.3.2-Mode opératoire

L'analyse des nitrates consiste à combiner 10 ml d'eau, 2 à 3 gouttes d'hydroxyde de sodium (NaOH) (**annexe 1**) et 1 ml de salicylate de sodium (**annexe 1**). Le mélange est ensuite séché au bain-marie où à l'étuve à une température de 75-88°C, traité avec 2 ml de l'acide sulfurique (H₂SO₄) pur, puis ajouté à 15 ml d'eau distillée et de tartrate double de sodium et de potassium (**annexe1**) (**Rodier, 2009**).

3.2.4-Dosage de sulfate

3.2.4.1-Principe

L'évaluation de la concentration en ions sulfate se fait à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 420 nm en précipitant les ions sulfates sous forme de sulfates de baryum en présence de chlorure de baryum (BaCl_2) (**Rodier, 2009**).

3.2.4.2-Mode opératoire

Tout d'abord, 20 ml d'eau sont prélevés, suivis de 5 ml de solution de stabilisant (**annexe 1**), tout est mélangé quelques secondes, 2 ml de chlorure de baryum (**annexe1**) ajouté, puis compléter la solution jusqu'à 100 ml avec la solution stabilisante. Le mélange est mélangé énergiquement pendant une minute, et enfin une lecture rapide (**Rodier, 2009**).

3.2.5-Dosage de ortho phosphates

3.2.5.1-Principe

Les ortho phosphates présents dans l'eau réagissent en milieu acide avec des ions molybdates et antimoinés pour former un complexe, qui est ensuite réduit par l'acide ascorbique en un composé bleu foncé. L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie, permettant ainsi l'estimation de la concentration en ortho phosphates (**ISO 6878**).

3.2.5.2-Mode opératoire

En premier lieu, 40 ml d'eau à analyser sont prélevés, puis 1 ml d'acide ascorbique (**annexe1**) et 2 ml de réactif mix (**annexe1**) sont ajoutés. Le mélange est remué pendant quelques secondes, puis laissé reposer pendant 10 à 30 minutes. Si aucune coloration n'apparaît, le résultat indique une concentration inférieure à 0,009 mg/l. En revanche, si une couleur bleue apparaît, la mesure doit être effectuée à 880 nm (**ISO 6878**).

3.2.6-Dosage du fer

3.2.6.1-Principe

Ajout d'une solution de phénanthroline-1,10 à un échantillon et mesure photométrique du complexe rouge-orange à une longueur d'onde de 510 nm. Le complexe fer (II)-

phénantroline-1,10 présente une stabilité dans une plage de pH de 2.5 à 9 et la force de la teinte est corrélée à la quantité de fer (**ISO 6332**).

3.2.6.2-Mode opératoire

Pour l'analyse, 1 ml de solution de chlorhydrate d'hydroxylamine (**annexe1**) et 2 ml de solution tampon d'acétate (**annexe1**) ont été mélangés à 50 ml d'eau à tester ont été prélevés dans une fiole jaugée de 100 ml. Le pH a été ajusté à 4,5. Ensuite l'ajoute 2 ml de solution de phénanthroline 1,10 (**annexe1**). La solution a été placée dans l'obscurité pendant 10 à 15 minutes (**ISO 6332**).



Photographie 03 : Appareil d'un spectrophotomètre.

3. 3-Méthode volumétrique

3.3.1- Dosage des ions bicarbonates

3.3.1.1-Principe

L'évaluation des concentrations en ions bicarbonate (HCO_3^-), carbonate (CO_3^{2-}) et hydroxide (OH^-) se fait par la détermination de la quantité d'acide chlorhydrique requise pour réduire le pH de l'échantillon à analyser jusqu'à 8,3 et 4,5. La première mesure (pH 8,3) est utilisée pour déterminer le titre alcalimétrique (TA), tandis que la seconde (pH 4,5) est employée pour calculer le titre alcalimétrique total (TAC) (**Rodier, 2009**).

3.3.1.2-Mode opératoire

Le calcul de concentration de bicarbonates se fait par l'application de l'équation suivante : $[TAC] \times 12,2 = \text{mg/L}$ (ADE, 2025).

3.3.2-Dosage de Calcium

3.3.2.1-Principe

Les ions calcium sont mesurés à l'aide d'une solution d'EDTA dans un milieu aqueux à un pH compris entre 12 et 13, avec du murexide comme indicateur. L'EDTA réagit avec le calcium pendant le titrage, ce qui entraîne un changement de couleur du rose au violet (ISO N° 6058).

3.3.2.2-Mode opératoire

Premièrement, 50 ml d'échantillon ont été prélevés, puis 2ml de NaOH (annexe1) ont été incorporés, suivis de l'ajout de 0,2g de HSN. La solution a ensuite été titrée avec de l'EDTA (annexe1), ce qui a permis d'obtenir une coloration violette (ISO N° 6058).

3.3.3- Dosage des ions chlorure

3.3.3.1-Principe

La détermination de la concentration en ions chlorure s'effectue par titrage au nitrate d'argent (AgNO_3), avec le dichromate de potassium (K_2CrO_4) servant d'indicateur. Les ions chlorure réagissent avec les ions argent pour former du chlorure d'argent (AgCl) insoluble, qui interagit avec l'indicateur (K_2CrO_4) pour donner la couleur brun-rouge du chromate d'argent (Ag_2CrO_4) (Rodier, 2009).

3.3.3.2-Mode opératoire

Afin d'analyser le chlorure, 1 ml de Chromate de potassium (K_2CrO_4) (annexe1) a été ajouté à 100 ml d'échantillon, qui a ensuite été titré avec nitrate d'argent (AgNO_3) (annexe1). La titration a donné une couleur rouge brique (Rodier, 2009).

3.3.4-Titre alcalimétrique total (TAC)

3.3.4.1-Principe

Le calcul du titre alcalimétrique (TA) est effectué en déterminant les volumes successifs d'acide fort en solution diluée nécessaires pour neutraliser le volume d'eau à examiner à des niveaux de pH 8.3 et 4.3. La seconde pour déterminer le titre alcalimétrique complet (TAC) (Rodier, 2009).

3.3.4.2-Mode opératoire

Tout d'abord, 100 ml d'échantillon ont été prélevés, puis 3 gouttes de méthyl orange ont été ajoutées. L'échantillon a ensuite été titré avec H_2SO_4 jusqu'à l'apparition d'un changement de couleur, passant du jaune à l'orange (Rodier, 2009).

3.3.5-Dureté totale TH

3.3.5.1-Principe

La mesure de la dureté totale de l'eau repose sur un titrage avec l'EDTA, un agent complexant capable de fixer les ions calcium et magnésium dissous. Ce titrage se déroule dans un environnement basique (pH avoisinant 10) et utilise un indicateur coloré dont le changement de teinte signale la fin de la réaction. La concentration en dureté est ensuite exprimée en milligrammes par litre de carbonate de calcium ($CaCO_3$) (ISO N° 6058).

3.3.5.2-Mode opératoire

En premier, 50 ml d'échantillon ont été prélevés, puis 4 ml de K10 (réactif tampon PH 10) ont été incorporés. Ensuite, 2 gouttes de NET ont été ajoutées avant de titrer avec de l'EDTA, ce qui a entraîné un virage bleu (ISO N° 6058).

3.3.6-Dosage de magnésium Mg

3.3.6.1-Principe

Le principe est le même que pour la mesure de la dureté calcique, mais l'utilisation de deux indicateurs permet de doser successivement, et sur un même échantillon, le calcium et le magnésium (Rodier, 2009).

3.3.6.2-Mode opératoire

Le calcul de concentration en Mg se fait par l'application de l'équation suivante :

(Volume EDTA 'TH' - V calcium) 4,86 = mg /L (ADE, 2025).

3.3.7-Titre alcalimétrique (TA)

3.3.7.1-Principe

Le même principe du titre alcalimétrique total (TAC) (Rodier, 2009).

3.3.7.2-Mode opératoire

Si l'eau de consommation a un pH inférieur à 8, cela signifie qu'elle n'est pas basique et que la TA=00 mg/l. En revanche, si le pH de l'eau de consommation est supérieur à 8, la procédure suivante doit être suivie : 100 ml d'échantillon sont prélevés, puis 2 gouttes de phénolphtaléine à 0,5 % sont ajoutées, ce qui donne une coloration rose. Un titrage est ensuite effectué avec de l' H_2SO_4 jusqu'à décoloration (Rodier, 2009).

3.3.8-Matière Organique

3.3.8.1-Principe

L'indice de permanganate d'un échantillon est la concentration en oxygène liée aux ions permanganates utilisés lors du traitement d'un échantillon d'eau avec du permanganate et de l'acide sulfurique. Après une période de 10 minutes, une portion du permanganate est réduite par les substances oxydables. La quantité restante est déterminée en ajoutant un surplus d'oxalate et en effectuant un titrage avec le permanganate (Rodier, 2009).

3.3.8.2-Mode opératoire

Initialement, 25 ml d'eau analysée ont été prélevés, puis 5 ml de H_2SO_4 (annexe1) ont été ajoutés. Le mélange a été homogénéisé avant d'être chauffé doucement jusqu'à ébullition, moment où 5 ml de $KMnO_4$ (annexe1) ont été incorporés. Après 10 minutes, 5 ml d'oxalate de sodium (annexe1) ont été ajoutés. Le titrage a ensuite été réalisé après l'élimination de la couleur, tout en maintenant la solution chaude, à l'aide de $KMnO_4$, jusqu'à l'apparition d'une couleur rose (Rodier, 2009).

3.4-Méthode Spectrophotomètre à flamme

Les mesures de sodium et potassium ont été réalisées à l'aide d'un Spectrophotomètre à flamme d'un type JENWAY®PFP7 Flame Photometer (**Photographie 04**).

3.4.1- Dosage des ions sodium

3.4.1.1-Principe

Lorsque qu'une solution est projetée dans une flamme, l'évaporation de l'eau ou du solvant se produit, tandis que les sels et leurs produits de dégradation se dissocient en atomes ou radicaux. Ces derniers sont excités par la chaleur de la flamme, et lorsqu'ils retrouvent leur état fondamental, ils émettent une radiation à une fréquence propre à l'élément dissous, dont l'intensité varie en fonction de la concentration de l'élément (**Rodier, 2009**).

3.4.1.2-Mode opératoire

Pour le titrage, une solution de sodium de 10 mg/litre a été préparée. La solution à blanc (eau distillée) a été employée pour confirmer que le signal primaire est stable et se situe près de zéro, avec une configuration manuelle. Ensuite, la solution étalon de 10 mg/l a été introduite, laissée aspirer et pulvérisée, puis la valeur a été manuellement ajustée à 10 mg/l sur l'appareil. L'analyse de la solution à blanc a été répétée pour vérifier que le signal était revenu à 0 mg/l. La solution étalon de 10 mg/l a été analysée à nouveau pour s'assurer que l'instrument affichait correctement la concentration sélectionnée. Il est conseillé de réaliser cette action à plusieurs reprises pour garantir la précision des résultats. Pour analyser un échantillon avec le spectrophotomètre à flamme, une dilution en fonction de sa conductivité est nécessaire afin d'éviter les interférences de mesure (**Rodier, 2009**).

3.4.2- Dosage des ions potassium

3.4.2.1-Principe

Le même principe de sodium (**Rodier, 2009**).

3.4.2.2-Mode opératoire

Même méthode de mesure du sodium, mais le sodium est remplacé par du potassium (**Rodier, 2009**).



Photographie 04 : Appareil de Mesure potassium et sodium (spectrophotomètre à flamme).

4-Etude bactériologique d'échantillons :

4.1- Traitement thermique

Les échantillons ont été soumis à un traitement thermique à 80°C pendant 10 minutes dans le but d'éliminer les formes végétatives.

4.2- Enrichissement

Les échantillons traités ont été inoculés dans un Bouillon Nutritif (BN) (**annexe2**) et incubés à différentes températures (30°, 37° et 45°) jusqu'à l'apparition d'un trouble dans le milieu.

4.3- Isolement et purification

Les souches ont été isolées et purifiées par repiquage successive sur la Gélose Nutritive (**annexe2**) additionnée de $MnSO_4$ (2,5 mg .L⁻¹).

5- Identification :

5.1- Etude des caractères phénotypiques des isolats

Étude des caractères phénotypiques des isolats peut orienter vers l'identification approximative de nos souches.

5.1.1- Caractères macroscopiques

L'observation des caractéristiques macroscopiques des colonies (telles que la forme, la couleur, la taille, la surface, disposition et contour, aspect etc.) a été réalisée à l'aide d'une

loupe binoculaire suite à leur développement sur un milieu solide après une période d'incubation de 24 à 72 heures.

5.1.2- Caractères microscopiques

Après une incubation de 24 heures à 30°C sur Gélose Nutritive (GN), les caractéristiques microscopiques des souches ont été identifiées.

5.1.2.1- Coloration de Gram

La coloration de Gram est utilisée pour identifier les bactéries gram-positives des bactéries gram-négatives. Et le protocole de cette coloration selon **Touaitia(2020)** est le suivant : Premièrement, préparation d'un frottis, Une goutte d'eau physiologique stérile a été appliquée sur la lame, et ajoutée une petite quantité de la colonie a été placée à l'aide d'un anse de platine, ensuite fixée et séchée à la chaleur en étant passée 3 ou 4 fois sur la flamme du bec Bunsen, La colonie a ensuite été recouverte de violet de gentiane, laissée pendant 1 minute et rincée à l'eau, puis recouverte de solution de Lugol (pour fixer la couleur) pendant 1 minute, de l'alcool a été ajouté, laissé pendant 30 secondes et rincé à l'eau, enfin la colonie a été recolorée avec de la fuchsine et laissée pendant 1 minute, suivie d'un rinçage final à l'eau, Après séchage, procéder à l'observation microscopique.

5.1.2.2- Coloration de vert de malachite

La mise en évidence de la sporulation a été effectuée par observation microscopique d'un frotti bactérienne coloré par vert de malachite comme décrite par **Dorner (1926)**, le protocole a été réalisé comme suit comme le montre la **figure 04** :

- ✓ La lame a été intégralement couverte de vert de malachite à 5%.
- ✓ La solution s'évapore lorsque la lame est chauffée.
- ✓ Laissez refroidir. La lame est lavée à l'eau courante.
- ✓ La lame est teintée avec de la fuchsine à 0,5% (attendre une minute avant d'observer).
- ✓ La lame a été rincée.

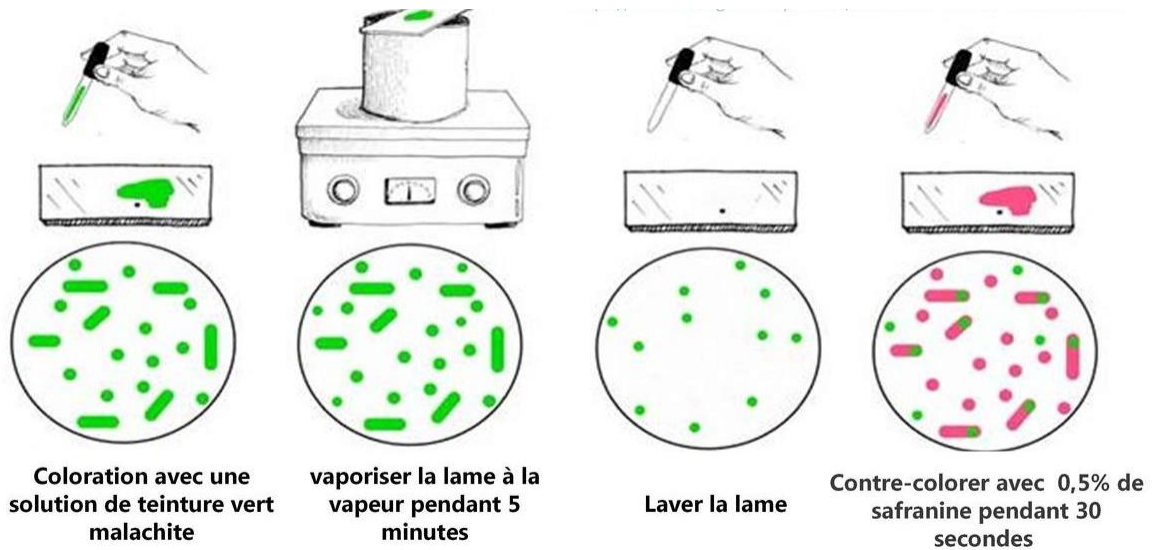


Figure 04 : Les étapes de coloration de vert de malachite «méthode de schaeffer-fulton» (microbiologie-clinique, 2025).

5.1.3- Caractères biochimiques

5.1.3.1- Recherche du type respiratoire

Dans l'objectif de déterminer le type respiratoire des bactéries isolées le protocole de **Guiraud (1998)** a été adopté. Une Gélose profonde à base de foie (VF) (**annexe2**) en surfusion (45°C) a été inoculée par une suspension de la souche à tester et incubé à température adéquate après 24 h d'incubation, on note la région dans le tube où une multiplication bactérienne a eu lieu. Ce qui va nous permettre de distinguer quatre types majeurs de modes respiratoires : Aérobie obligatoires, qui se développent uniquement dans la couche superficielle.

- Anaérobies stricts, qui se cultivent uniquement en profondeur.
- Aérobie-anaérobies facultatives, elles se propagent sur toute la hauteur de l'environnement.
- Micro-aérophiles, qui créent une zone intermédiaire entre l'aérobiose et l'anaérobiose.

5.1.3.2- Recherche de catalase

Pour détecter cette enzyme, une colonie pure de la souche à tester a été mise en contact avec une goutte de peroxyde d'hydrogène sur une lame en verre stérile. La présence de bulles

de gaz indique que la souche est catalase positive comme indiqué sur la **figure 05 (Delarras Camille, 2007)**.

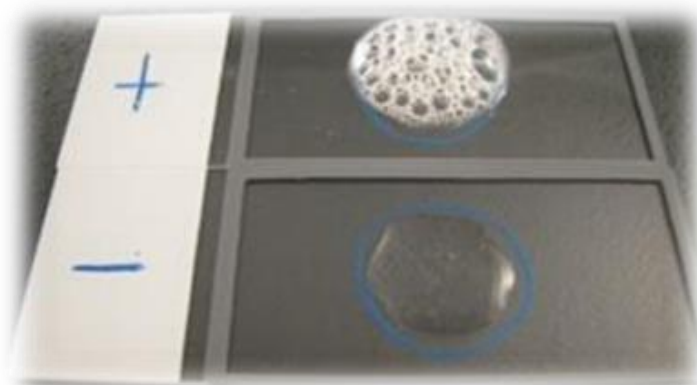


Figure 05 : Test de la catalase (Reiner, 2010).

5.1.3.3- Recherche de l'oxydase

La présence de cytochrome oxydase peut être détectée à l'aide d'un disque d'oxydase saturé de N-N-diméthyl-paraphénylènediamine oxalate. Pour le test, une quantité appropriée de culture (suspension bactérienne) est placée sur le disque. En cas de réaction positive, une couleur bleu-violet apparaît (**Joffin et Leyral, 2006**).

5.1.3.4-Recherche de ONPG (Orthonitro-Phenyle -B-Galactoside)

Après la préparation d'une suspension concentrée d'une culture bactérienne dans un tube stérile contenant 1 ml d'eau physiologique, on introduit un disque ONPG, puis on laisse incuber à 37°C pendant 24h. Le test est considéré comme positif lorsque la suspension bactérienne prend une couleur jaune citron (**Paul, 1999**).

6-Recherche de la production des activités enzymatiques:

6.1- sur milieu gélosé

L'identification de l'activité enzymatique produite par les isolats, a été réalisée sur un milieu gélosé additionné du substrat adéquat. L'interprétation des résultats a été effectuée après une incubation de 3 jours à une température de 30°C.

6.1.1- Recherche de l'activité protéasiques

6.1.1.1- Hydrolyse de la gélatine

La technique implique la répartition d'une culture sur des boîtes de pétri contenant une Gélose nutritive additionnée de 1% de la gélatine (**annexe2**), Après incubation, une solution de chlorure mercurique (3,45g) est ajoutée. L'hydrolyse de la gélatine se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (**Williams et Cross, 1971**).

6.1.1.2- Hydrolyse de la caséine

L'aptitude des isolats à dégrader la caséine a été évaluée sur un milieu gélosé contenant 50 % (p/v) de lait écrémé (**annexe2**), Les boîtes ont étéensemencées par une ligne tracée au centre de la boîte. Après 3 jours d'incubation à une température de 30°C, une zone claire autour des colonies a été considérée comme une preuve d'activité protéolytique (**Camille, 2007**).

6.1.2- Recherche de l'activité amylolytique

La production d'amylase a été étudiée en incorporant 1% (p/v) d'amidon soluble dans le milieu de culture Gélose nutritive (**annexe2**) .Après l'incubation, les cultures ont été traitées avec 1% solution de Lugol afin de révéler les zones où l'amidon a été dégradé par les bactéries ce qui se manifeste par l'absence de coloration autour de la culture positive tandis que les zones riches en amidon prennent une teinte brune on les exposant à la lumière du jour (**Praveen et al., 2015**).

6.1.3-Recherche des activités estérasiques

6.1.3.1- Hydrolyse du Tween 80

Pour déterminer si les micro-organismes sont capables de dégrader le Tween 80 (**annexe2**) , un test a été réalisé en additionnant 1 % (v/v) de ce substrat dans le milieu de culture GN, puis des boîtes ont étéensemencées par une ligne au centre, la culture dans laquelle une zone opaque apparaît autour des colonies, après l'incubation, est interprétée comme un signe d'hydrolyse positive (**Kumar et al., 2012**).

6.1.3.2- Recherche de lécithinase

La mise en évidence de la production de lécithinase a été effectuée sur Gélose nutritive supplémentée à 10 % p/v de l'émulsion de jaune d'œuf (**annexe2**). L'apparition d'une zone claire autour de la culture indique la synthèse de la lécithinase par les isolats (**Jean et Guy, 2014**).

6.1.4-Recherche de l'activité cellulosique

La capacité des micro-organismes à hydrolyser la cellulose a été évaluée en incorporant 1 % (p/v) de cellulose dans le milieu de culture GN (**annexe2**). Après incubation, les cultures ont été traitées avec une solution de Rouge Congo (1 % p/v) pendant 20 minutes, puis la surface de la culture a été recouverte avec une solution de NaCl (1M) pendant 15 minutes. La formation de zones de lyse claires autour des colonies est une preuve de l'hydrolyse de la cellulose (**Thaz et al., 2015**).

6.1.5 -Recherche de l'activité xylanolytique

L'activité de la xylose a été déterminée selon **Bailey et al. (1992)**, brièvement, le test a été effectué en appliquant la même méthode précédente (recherche de cellulase) avec une légère modification en remplaçant la cellulose par xylose (**annexe2**).

6.1.6 -Recherche de l'activité Esculinase

La Gélose bile esculinase a été utilisée pour la mise en évidence de la production d'esculinase après 72 heures d'incubation l'apparition de colonies translucides entourées d'un halo noir à la surface du milieu constitue une preuve d'activité esculinase positive (**Larpen, 1997**).

6.1.7 -Recherche de l'activité hémolytique

On a utilisé la Gélose au sang cuit pour la détermination du pouvoir hémolytique (**annexe2**). Après solidification de la Gélose, les souches ont été ensemencées par une seule ligne au centre de la boîte de Pétri. Puis incubées à 37°C pendant 24 heures (**Maragkoudakis et al., 2006**).

❖ Des souches Beta-hémolytiques (β) se caractérisent par la présence de colonies encerclées d'une zone franche d'hémolyse.

- ❖ Milieu autour de la colonie devient verdâtre (ce qui entraîne la production de peroxyde d'hydrogène). Il s'agit d'une présence d'hémolyse alpha (α).
- ❖ Le milieu reste inchangé, il s'agit d'une hémolyse gamma.

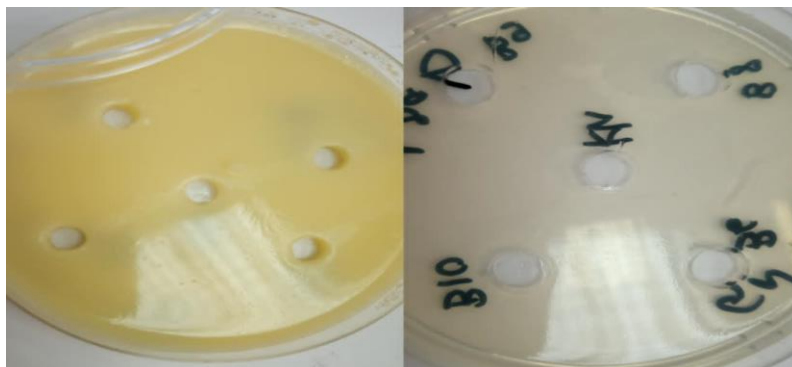
6.2-Évaluation de l'activité enzymatique du surnageant

Afin de déterminer l'activité enzymatique du surnageant, les cinq souches les plus performantes, issues de l'étude des activités sur milieu gélosé, ont été sélectionnées. Le surnageant a été préparé en inoculant 50 ml de bouillon nutritif avec les souches à tester. Après 48 h d'incubation, la culture a été centrifugée à 10 000 rpm pendant 15 minutes comme indiqué sur la **Photographie 05** pour éliminer le culot contenant les cellules bactérienne.



Photographie 05: Photo de Centrifugeuse (10 000 rpm pendant 15 minutes).

Les mêmes milieux utilisés précédemment pour l'évaluation des différentes activités enzymatiques ont été employés pour tester l'activité de surnageant en créant des puits (**Photographie 06**) de 6 mm de diamètre, ces derniers ont été remplis de 50 μ l de surnageant, les résultats sont révélés de la même façon que sur les milieux gélosés (**Benbekhti, 2024**).



Photographie 06: Photo montrant la technique des puits.

6.2.1-Évaluation de la thermo-stabilité du surnageant

Les surnageants actifs ont été subies un traitement thermique dans un bain marie pendant 10 min en les exposant à différentes températures 37, 50 et 90°C. L'interprétation des résultats se fait de la même façon que celle du surnageant non traité et les résultats sont comparés à ceux des surnageants traités (**Benbekhti, 2024**).

7-Criblage des activités antimicrobiennes des isolats :

Trois souches ont été sélectionnées pour évaluer l'activité antimicrobienne en se basant sur leur site d'isolement.

7.1- Extraction des métabolites secondaires

Afin d'extraire les métabolites secondaires produites par nos isolats et que nous supposons avoir un effet antagoniste contre certains souches bactériennes, les souches à tester ont été incubées dans un bouillon nutritif pendant une semaine à 30°C sous agitation orbitale 120 rpm dans l'objectif d'atteindre l'idiophase, Ensuite le surnageant a été récupéré par centrifugation à 4500 rpm pendant 15 min sous une température de 4°C et le surnageant résultant a été mélangé avec le même volume d'acétate d'éthyle, cette opération a été suivie d'une évaporation avec un évaporateur rotatif (**Photographie 07**) afin de séparer le solvant des métabolites secondaires et l'extrait brut résultant a été dissous dans du méthanol pour attendre une concentration de 200 mg /ml (**Bhardwaj et al., 2015**).



Photographie 07:Appareil de rotavap pour récupération d'extrait d'échantillon.

7.2-Teste de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne a été évaluée vis-à-vis les souches suivantes : *Escherichia coli* NCTC 10538, *Salmonella* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* NCIMB 8626, par le test de diffusion des disques imbibé de 20µL de l'extrait à une concentration 200 mg /ml sur milieu gélosé de type Mueller Hinton (**annexe2**). Préalablement ensemercer par écouvillonnage d'une suspension bactérienne dans l'eau physiologique ajustée à une densité de 0,5 McFarland et incubées à 37°C pendant 24 h (Sacchetti et al.,2005;Celiktas et al., 2007).

Résultats et discussion

1-Paramètres physico-chimiques :

L'étude des paramètres physico-chimiques des différentes sources thermales révèle une grande diversité en termes de composition et de propriétés.

Les résultats présentés dans le **tableau 01** permettent de comparer les caractéristiques physico-chimiques des eaux des différentes sources thermales étudiées, la température de l'eau varie considérablement en fonction du site, allant d'une eau très chaude à Hammam Essalihine (77°C) à une température beaucoup plus modérée à Tamersit (28,7°C **photographie 08**), plus de 240 sources thermales ont été référencées sur le territoire algérien (**Saibi, 2009**) dont les températures varient de 28,7°C (présente étude) jusqu'à 98 °C à Hammam Debagh (**Arab et al., 2018**).

Tableau 01 : Résultats des analyses physico-chimiques d'échantillons.

	Hammam Tamersit	Hammam Essalihine	Hammam El knif
Tm °C	28,7°C	77°C	55°C
PH	7,52	7,51	7,59
Cond μS/cm	1998	3110	3620
Turbid NTU	0,16	1,61	0,162
NH₄⁺ mg/l	0,014	0,052	0,011
NO₂⁻ mg/l	0	0	0
PO₄³⁻ mg/l	/	0,221	0,125
SO₄²⁻ mg/l	16,054	72,128	88,772
Fe²⁺ mg/l	0	0	0,024
NO₃⁻ mg/l	0	0,494	1,319
Na⁺ mg/l	68	78	136,8
K⁺ mg/l	0,8	4,5	17
[Cl⁻] mg/l	7,10	265,86	1086,3
[TAC] mg/l	303	119	139
[HCO₃] mg/l	396,66	145,18	169,58
[TH] mg/l	356	440	436
[Ca⁺²] mg/l	78,556	64,128	160,32
[Mg] mg/l	38,88	68,04	8,748
M.O mg/l	10,88	1,152	7,21



Photographie 08: La température de Hammam Tamersit.

Le pH reste globalement neutre à légèrement basique dans toutes les sources étudiées, comparativement au pH de l'eau du Hammam Essalihine étudiée par **Belahssini et al. (2011)**, On a rapporté un pH légèrement plus élevé (pH = 8) que celui observé (pH = 7,5). Cela pourrait être dû à une différence dans le point exact de mesure.

Hammam El Knif se distingue par la concentration en NO_3^- élevée (1,319 mg/L), traduisant une importante présence de matière organique transformée (**Banas, et Lata, 2006**). Ceci indique que la source Hammam El Knif est plus riche en micro-organismes capables de transformer la matière organique brute, Cela peut s'expliquer par la température plus basse de la source de Hammam El Knif, qui permettrait à un éventail plus large d'espèces microbiennes de coloniser cette niche écologique. Cette source est également la plus riche en minéraux telle que le sulfates (88,772 mg/L), le sodium (136,8 mg/L) et le potassium (17 mg/L), ce qui pourrait être dû à la nature des roches traversées par cette eau, le niveau élevé de conductivité (3620 $\mu\text{S}/\text{cm}$) observé à hammam ELknif est une preuve supplémentaire de sa richesse en minéraux ,dans ce cadre il a été signalé que les eaux souterraines ont tendance à être plus riches en minéraux et donc auront une conductivité plus élevée (**Khatri et Rajvanshi, 2019**) . En comparaison avec les résultats des eaux thermales de Zelfana dans le sud algérien (Ghardaïa), étudiés par **Benbada et Bouti (2023)**, il apparaît que la source de Hammam El Knif présente une conductivité et des concentrations en sulfate et en potassium plus élevées. En revanche, les eaux de Zelfana affichent une concentration la plus élevée en sodium (256,25mg/l), suivies par celles de Hammam Elknif, suivies Hammam Essalihine, puis de Hammam Tamersit. Les différences observées entre les sources peuvent être expliquées par la nature géologique des terrains traversés, la profondeur des nappes, et le temps de contact entre l'eau et les roches (**Benmoussa et al., 2018**).

De son côté, Hammam Tamersit présente la plus forte concentration en matière organique brute (10,88 mg/l), dépassant largement les autres sources, Cela peut être liée à une faible activité microbienne (**Banas et Lata, 2006**), c'est-à-dire à une présence modérée ou une efficacité limitée des micro-organismes en matière de dégradation de la matière organique, cette concentration en matière organique brute est nettement supérieure à celle référencée à Hammam El Bouhanifia qui est de l'ordre de 2,8 mg/L (**Labгаа et Labed, 2018**).

Les eaux prélevées de site Tamersit affichent des concentrations les plus élevées en bicarbonates (HCO_3^-), Cette forte teneur suggère que l'eau de cette source traverse fréquemment des roches riches en carbonates, telles que le calcaire. Le TAC (Titre Alcalimétrique Complet) reflète la capacité de l'eau à résister aux variations de pH, et dépend principalement de la concentration en bicarbonates **Chekroun et al. (2024)**, c'est le cas de la source Tamersit. Ainsi, un TAC élevé est directement lié à une teneur importante en HCO_3^- . En comparaison avec les résultats obtenus à Hammam K'sana, situé à Bouira étudié par **Chekroun et al. (2024)**, la concentration en bicarbonates s'est révélée plus élevée (519,11mg/l) que les trois sources étudiées dans ce travail, Les différences de concentrations en bicarbonate entre les eaux thermales indiquent que chaque source possède des caractéristiques géologiques particulières, liées à la nature des roches rencontrées par l'eau et au temps qu'elle passe dans le sous-sol (**Benmoussa et al., 2018**). tandis que Hammam El Knif présente des teneurs très élevées en chlorures (Cl^-), cela signifie que l'eau provient des profondeurs de la terre, où elle a circulé à travers des roches riches en sels et en minéraux solubles (**Sekula et al., 2020**), ce qui explique sa forte teneur en chlorures, En comparaison avec les résultats de l'étude menée par **Aissat et Mekki (2019)** sur les eaux thermales de Hammam Guergour, Hammam El Knif présente les concentrations les plus élevées en chlorures(789,66 mg/l) .

La variation des concentrations en orthophosphates peut refléter des différences dans le niveau de dégradation de la matière organique, l'activité microbienne ou les réactions chimiques propres à chaque source d'eau (**Feng et al., 2023**) cette différence a été observée en comparant les concentrations dans les trois sources étudiées (**tableau 1**) ainsi, les taux élevés d'orthophosphate sont un indice d'eutrophisation des eaux (**Correll, 1998**) ce qui a été observé à Tamersit dont la concentration en orthophosphate est plus élevée que la limite supérieur de détection.

Hammam El Knif se caractérise par une eau très minéralisée, surtout en chlorures et sulfates, due à un parcours souterrain long à travers des roches salines. Hammam Tamersit montre une eau bicarbonatée riche en matière organique, signe de terrains carbonatés et d'une faible activité microbienne. Hammam Essalihine présente une eau modérément minéralisée, au pH neutre à légèrement basique. Chaque source reflète une géochimie spécifique selon sa géologie et sa microbiologie.

2-Étude bactériologique d'échantillons:

Les bactéries du genre *Bacillus* sont largement isolées à partir d'écosystèmes extrêmes, notamment thermophiles et salins, (Yakhlef et al., 2012; Benkhoul et al.,2017; Arab et al., 2018 ; Gomri et al., 2018 ; Aissaoui et al.,2019 ; Bouacem et Bouanane, 2021).

Dans la présente étude, le traitement thermique nous a permis d'éliminer toutes les formes végétatives et de sélectionner uniquement les bactéries sporulantes. L'étude des caractères phénotypiques, notamment la morphologie (**Photographie 09**), les caractères cultureux et biochimiques (**annexe 03**), nous a permis d'identifier 9 souches appartenant au genre *Bacillus* (**Tableau 02**). 78 % d'entre eux sont isolées du site de HK, suivies des sites de HS et HT (**Figure 06**). Ces résultats confirment ceux rapportées par **Benammar et al. (2020)** qui ont également isolé des bactéries du genre *Bacillus* aux sites HS et HK. En revanche, cette étude représente le premier rapport de l'isolement des souches de *Bacillus* (B11) provenant de la source Hammam Tamersit.

Tableau 02 : Le nombre des isolats dans chaque lieu d'échantillonnage.

	Hammam Essalihine	Hammam Elknif	Hammam Tamersit
Nombre des isolats	01 isolat (B4)	07 isolats (B5, B6, B7, B8, B9, B10, B13)	01 isolat (B11)

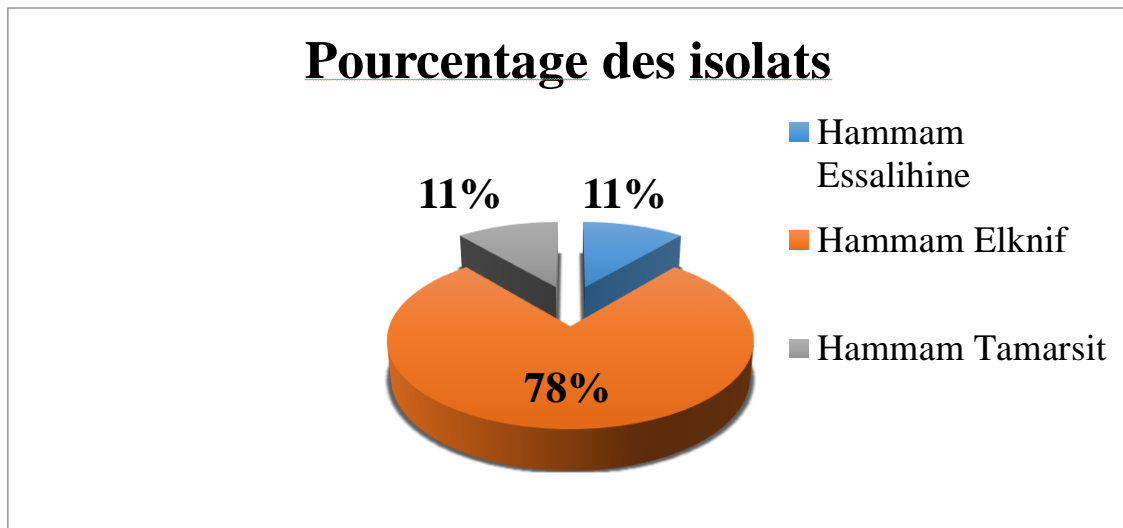
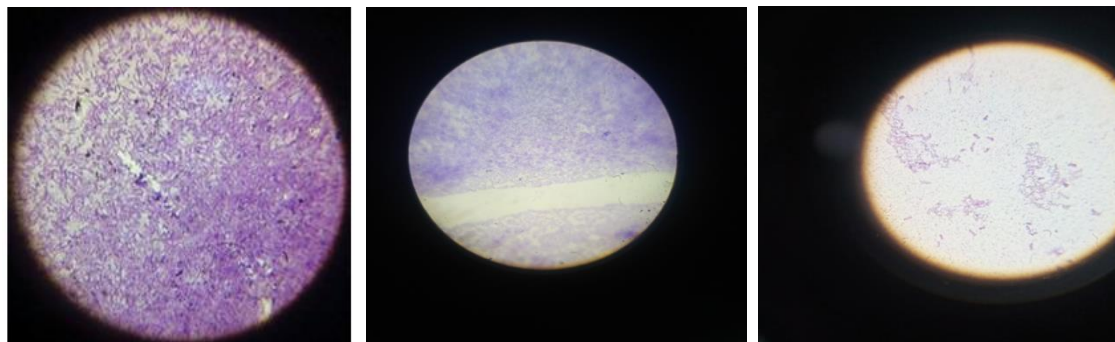


Figure 06 : Cercle relatif indiquant la proportion d'isolats dans chaque lieu d'échantillonnage.

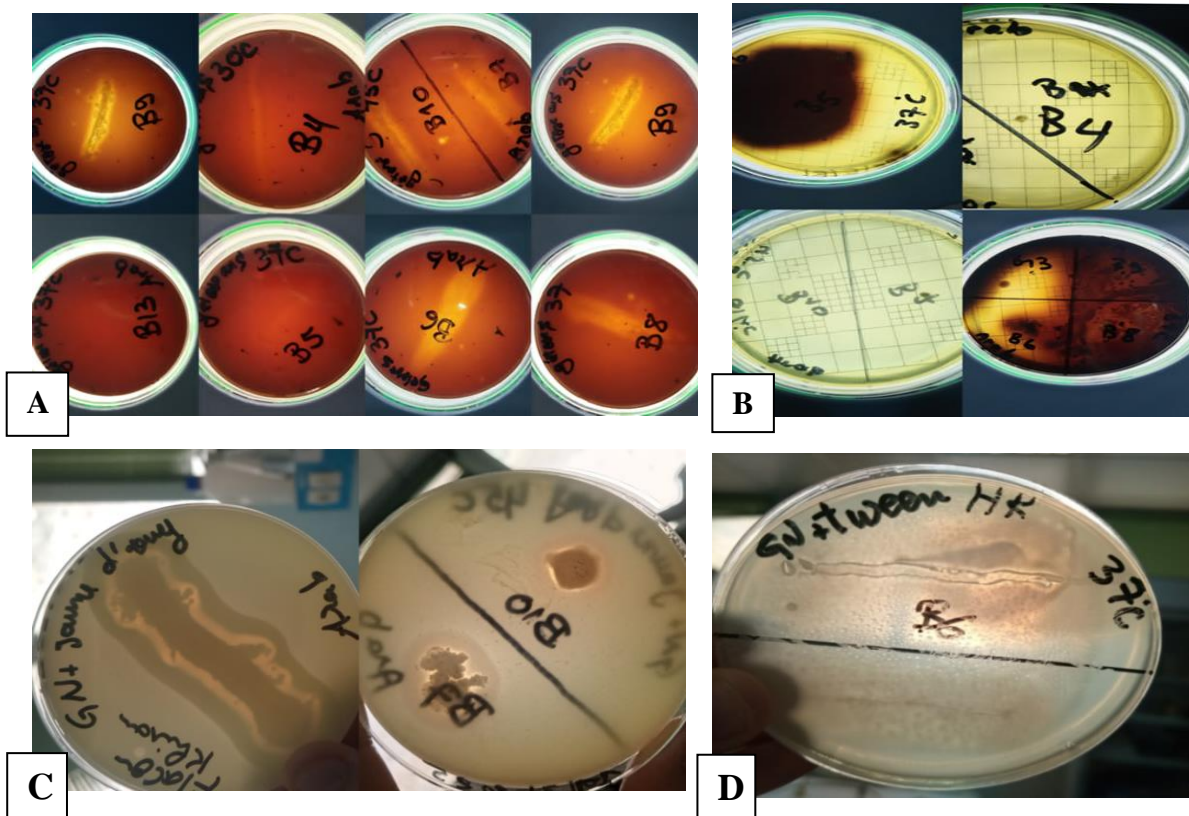


Photographie 09 : Exemples d'observation au microscope photonique (x100). Coloration de Gram des isolats.

3 -Recherche de la production des activités enzymatiques :

3.1- sur milieu gélosé

Après ensemencement des 9 isolats sur milieu Gélose nutritive enrichi avec les substrats : l'amidon, la cellulose, la xylose, la caséine, la gélatine, l'émulsion de jaune d'œuf, Tween 80, et milieu Gélose au sang, bile esculine nous a permis d'évaluer l'activité hydrolytique. Les résultats sont présentés dans la **Photographie 10** et **les figures 07 et 08** :



Photographie 10: Exemples des résultats de l'activité enzymatique **A:**Hémolytique, **B:** Esculinase, **C:** Lécithinase et **D:** Esterase.

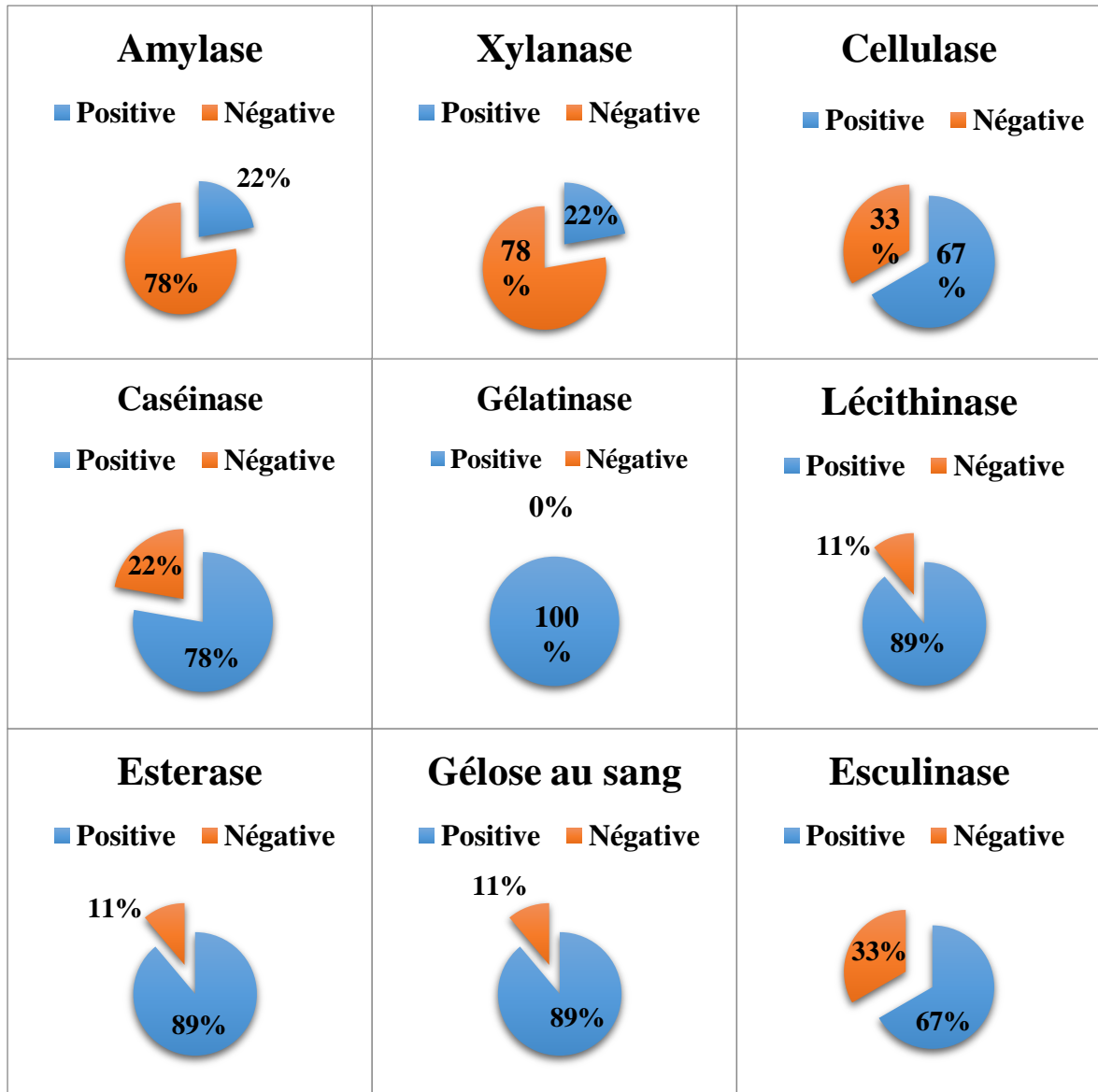


Figure 07: Cercles relatifs montrant l'activité enzymatique dans les souches.

Ces diagrammes circulaires illustrent la répartition en pourcentage des différentes activités enzymatiques chez les souches étudiées. On observe une variation dans la capacité des souches à produire certaines enzymes, comme la gélatinase (100 % positives), par rapport à d'autres tels que l'amylase et la xylanase (seulement 22 % positives).

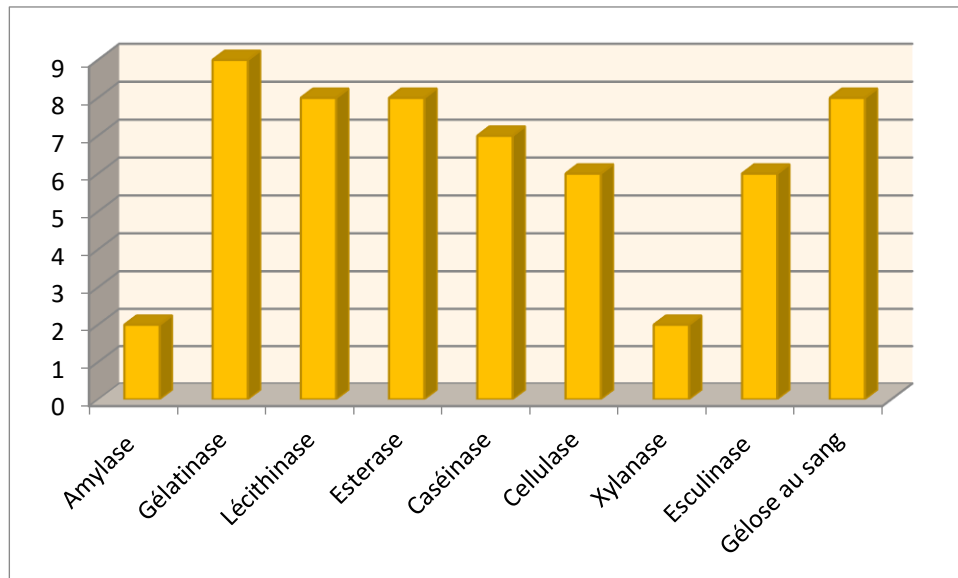


Figure 08 : Activité enzymatique des isolats bactériens sur différents substrats.

Photographie 10 et les **figures 07** et **08** illustrent les résultats de l'activité enzymatique de nos isolats dont la capacité d'hydrolyse de la gélatine était présente chez 100% des souches, suivie des activités lécithinase et esterase avec un taux 89%, tandis que 7souches étaient capable de dégrader la caséine, en plus 67% des isolats s'y avéraient cellulase, esculinase positive. La production d'amylase et de xylose était relativement faible, avec des taux ne dépassant pas 22%, dans notre étude on a aussi remarqué un effet souche où la souche B10 s'est révélée la plus performante en termes d'activité enzymatique, avec la capacité de dégrader tout les substrats testés, suivie des souches B8 et B9, avec 7 activité hydrolytique positives. En revanche, les tests sur les souches B4, B5, B6, B7, B11 et B13 ont montré que ces dernières avaient des activités enzymatiques modérées (actives sur 6 à 5 substrats).

En termes d'activité dégradative (caséinase, xylanase, cellulase et amylase), nos souches ont présenté des performances inférieures à celles isolées par **Bouassem (2016)** dans son étude à Hammam Righa (d'Aïn Defla) et Melouane (Blida), qui a montré respectivement des taux d'activité de 12 %, 48 %, 31 % et 58 %, soient des performances supérieures à celles obtenues dans notre étude. Alors que le Tween 80 était 19% plus élevé dans notre étude ,Cette différence peut s'expliquer par la diversité génétique des souches de chaque régions. Quant à l'activité gélatinase était de 100 % dans les deux études. De même, les souches isolées par **Benkahol et al. (2017)**, étaient plus performantes en termes d'activité enzymatique, notamment les activités protéolytiques, amylolytique et cellulolytique.

3.2- Évaluation de la thermo-stabilité du surnageant (milieu liquide)

La figure 09 montre que l'activité enzymatique varie en fonction de la température, ce qui reflète la thermo-sensibilité des enzymes produites par nos isolats. Ainsi les activités de l'amylase, la gélatinase, la lécithinase et l'estérase étaient plus prononcées à 37°C contrairement aux autres températures testées. En revanche, la xylanase à garder son activité même à une température élevée (90°C) ce qui reflète la thermo-résistance de cette enzyme.

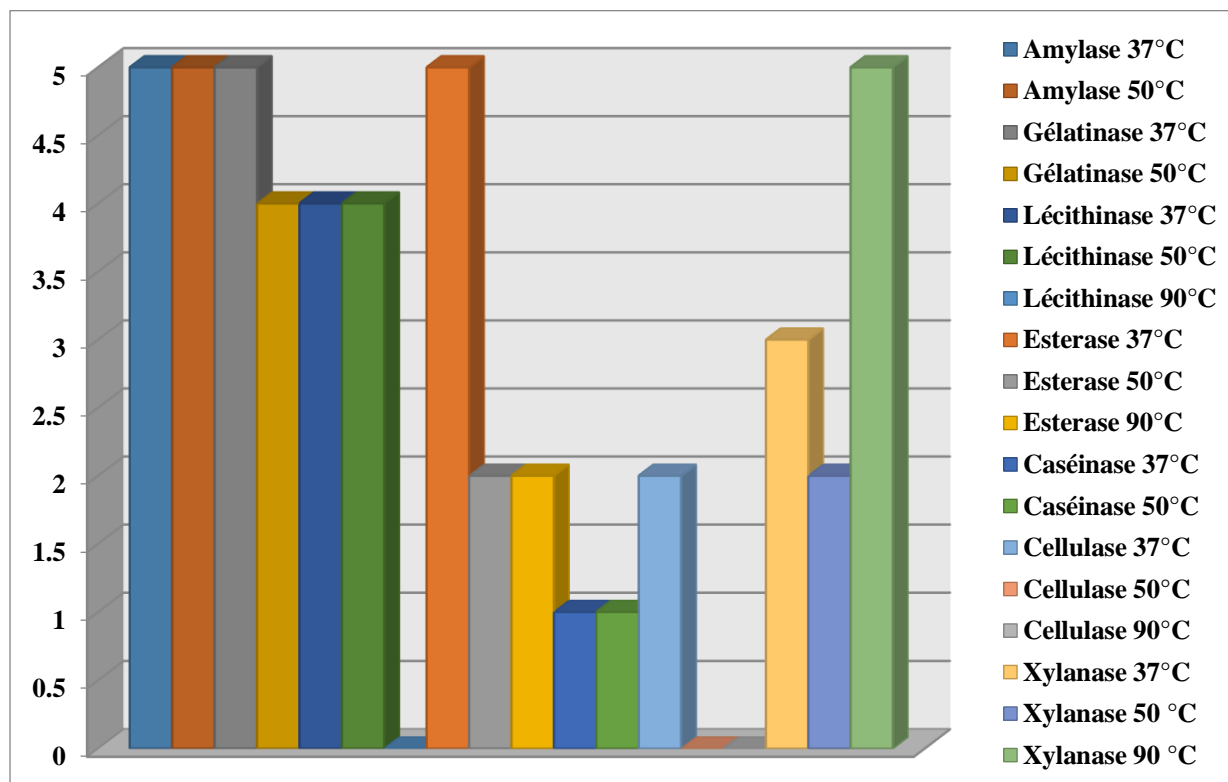


Figure 09 : Variation de l'activité des enzymes hydrolytiques en fonction de la température chez les souches étudiées.

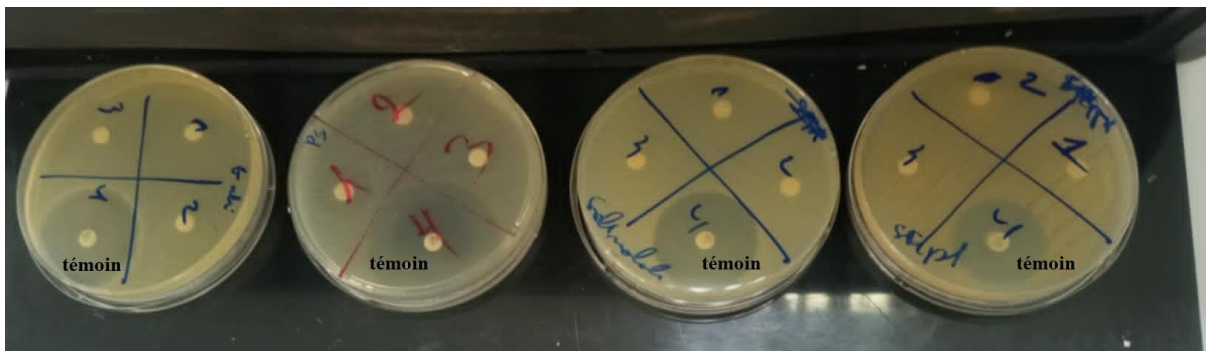
L'activité estérase et gélatinase ont été diminuées respectivement de 60 % et 20 % sous l'effet du traitement à 50°C, cette même température a pu inactiver totalement la cellulase ceci peut être expliqué par la perte de la structure tridimensionnelle des enzymes responsables des activités précédentes sous l'influence des hautes températures et le temps d'exposition, vu la nature protéique des enzymes (Zheng et al., 2011).

Nos résultats sont en discordances avec ceux rapportés par Benbekhti (2024), qui ont montré une augmentation notable de l'activité caséinase dans le surnageant traité à 55 °C, suivie d'une diminution à 70 °C et d'une disparition totale à 100 °C, cette divergence pourrait

s'expliquer par des différences dans la nature des enzymes, les souches bactériennes utilisées. Elle illustre également que chaque enzyme possède un profil de thermo stabilité spécifique.

4-Criblage des activités antimicrobiennes des isolats :

Après le teste de l'activité antimicrobienne et incubation à 37°C pendant 24 h, aucun des extraits n'a montré une activité significative vis à vis les souches testées comme indiqué sur **Photographie 11**. Contrairement aux observations de **Belhaine et Latreche, (2016)** et **Aissaoui et al, (2019)** qui ont observé des activités antimicrobiennes significatives.



Photographie 11 : Résultats d'activités antimicrobiennes des isolats.

Conclusion et perspectives

L'étude menée sur la flore aérobie sporulée isolée des sources thermales de la région de Khenchela a permis de mettre en évidence la richesse et la diversité microbienne de cet environnement extrême, elle constitue également la première exploration microbiologique de la source thermale Tamersit, ouvrant ainsi la voie à de futures recherches sur cette source encore mal explorée.

Le criblage des isolats obtenus a révélé la présence de souches très actives sur le plan enzymatique, notamment des gélatinase, lécithinase, esterase, caséinase, cellulase, et esculinase, en revanche les isolats étudiés ont montrées une absence d'activité antimicrobienne significative, bien que l'activité antimicrobienne soit absente, la richesse enzymatique observée confère à ces micro-organismes un intérêt biotechnologique considérable, notamment dans les domaines agroalimentaire par exemples les protéases (comme la caséinase) sont utilisées pour la fabrication de fromages et l'attendrissement de la viande, les amylases et cellulases interviennent dans la clarification des jus, la dégradation de fibres végétales ou la production de sirops à haute teneur en glucose , pharmaceutique certaines enzymes comme l'estérase ou la lécithinase peuvent être exploitées dans la synthèse de médicaments, Ou environnemental des enzymes comme la cellulase et l'estérase jouent un rôle clé dans le traitement des déchets organiques, la biodégradation de biomasse ou encore dans des procédés de biorémediation, visant à dépolluer les sols ou les eaux contaminées.

Il serait intéressant de mener plus loin l'étude sur les souches isolées, surtout sur le plan génétique, qui sert à prouver leur originalité, et sur le plan enzymatique afin d'optimiser la production des enzymes d'intérêt.

Références bibliographiques

- Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., & Sahin, F. (2009). Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of microbiological methods*, 79(3), 321-328.
- Aissaoui, N., Mahjoubi, M., Nas, F., Mghirbi, O., Arab, M., Souissi, Y., ... & Klouche-Khelil, N. (2019). Antibacterial potential of 2, 4-di-tert-butylphenol and calixarene-based prodrugs from thermophilic *Bacillus licheniformis* isolated in Algerian hot spring. *Geomicrobiology Journal*, 36(1), 53-62.
- Aissat, I., et Mekki, N. (2019). Isolement et caractérisation de bactéries de la source naturelle de Hammam Guergour (Nord de Sétif-Algérie) (Mémoire de Master, Université Mohamed Boudiaf - M'sila, Algérie). <https://repository.univ-msila.dz/server/api/core/bitstreams/a1eb44b0-35e2-4816-93e1-216d9f8a93eb/content>.
- 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.
- Arab, M., Bakour, S., Lalaoui, R., Aissaoui, N., Nas, F., Hoceini, A., Fournier, P. E. & Klouche-Khelil, N. (2018): Diversity Of Aerobic Bacilli Analysis Using Molecular And Culture Based Approaches In Debagh Hot Spring, *Geomicrobiology Journal*, Doi: 10.1080/01490451.2018.1520937.
- Bailey, M.J., P. Biely and K. Poutanen, 1992. Laboratory testing of method for assay of xylose activity. *J. Biotechnol.*, 23: 257-270.
- Banas, D., & Lata, J. C. (2006). Nitrates. *The White Paper Pollutants Habitat*.
- Belahssini, K., Goumeidane, A. E., & Naili, O. (2011). Étude de la qualité microbiologique et physico-chimique de l'eau de Hammam Essalihin (El Hamma, Wilaya de Khenchela) [Mémoire de Master, Université 8 Mai 1945 Guelma, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Spécialité : Santé, Eau et Environnement].
- Belhaine, B., et Latreche, M. (2016). Isolement et criblage enzymatiques et antimicrobiens de bactéries thermophiles de Hammam Debagh [Mémoire de Master, Université 8 Mai 1945 Guelma]. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Département de Biologie.
- Benammar, L., Inan Bektaş, K., Menasria, T., Beldüz, A. O., Güler, H. I., Bedaida, I. K., González, J. M., & Ayachi, A. (2020). Diversity and enzymatic potential of thermophilic bacteria associated with terrestrial hot springs in Algeria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(4), 1987–2007.

- Benbada, S., & Bouti, I. (2023). Évaluation des caractéristiques physico-chimiques des eaux thermales : Cas de la région de Zelfana, Ghardaïa [Mémoire de master, Université de Ghardaïa]. Université de Ghardaïa.
- Benbekhti, M. (2024). Criblage d'enzymes d'intérêt biotechnologique à partir des bactéries extrêmophiles isolées de la grande sebkha d'Oran [Mémoire de master, Université (ABOU BAKR BELKAID de Tlemcen)]. Filière Sciences Biologiques, spécialité Microbiologie et Contrôle de Qualité.
- BENKAHOUL, M., TALHI, A., & BOULEFKHAD, N. (2017). Bactéries des environnements chauds Algériens: isolement et mise en évidence de la production d'hydrolases. *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 25-35.
- Benmoussa, A., Sedrati, A., Belkoun, N., Houha, B., & Darbouche, A. (2018). Chemical and isotopic characterization of the thermal waters of Hammam Skhouna, Algeria. *Journal of New Technology and Materials*, 8(2), 94–99.
- Benzaim, A. (2025, 5 mars). Entretien avec un technicien de l'entreprise ADE sur la qualité de l'eau [Communication personnelle].
- Bhardwaj A, Sharma D, Jodan N, Agrawal PK (2015) Antimicrobial and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from spikes of *Pinus roxburghii*. *Arch Clin Microbiol* 6(3):1–9.
- Bouacem, K. (2016). Caractérisation de souches bactériennes isolées à partir de sources thermales du Nord-Algérien : Étude des propriétés enzymatiques [Thèse de doctorat, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene].
- Bouacem, K., & Bouanane-Darenfed, A. (2021). Isolation and characterization of thermophilic bacteria as producers of enzymes from Hammam Righa hot spring. *Proceedings of the MOL2NET*, 21.
- Boughari, S., & Marouf, G. (2017). Caractérisation physico-chimique des eaux therminérales de Hammam Serguine - Wilaya de Tiaret [Mémoire de master, Université Ibn Khaldoun – Tiaret].
- Brock, T.D., 2001. In: Reysenbach, A.L. (Ed.), *Thermophiles; Biodiversity, Ecology and Evolution*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 1–22.
- Camille D., 2007. *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Edition Lavoisier Pp : 156.

- Cavicchioli, R., Amils, R., Wagner, D., & McGenity, T. (2011). Life and applications of extremophiles. *Environmental Microbiology*, 13(8), 1903–1907. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02512.x>.
- Celiktaş, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.*, 100: 553–559.
- Chekroun, T., Hadj Kaddour, B., & Ingrachen, A. (2024). Caractérisation physico-chimique et microbiologique des eaux thermales de la source Hammam K'sana (Fraksa) à Bouira : Étude du potentiel enzymatique des souches isolées [Mémoire de master, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou].
- Correll, D. L. (1998). The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: A review. *Journal of Environmental Quality*, 27(2), 261–266. <https://doi.org/10.2134/jeq1998.00472425002700020004x>.
- Crabb, J. W., Murdock, A. L., & Amelunxen, R. E. (1974). A proposed mechanism of thermophily in facultative thermophiles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 62(3), 627–633.
- Dorner W. (1926) Un procédé simple pour la coloration des spores. Avec une planche en couleurs. *Le Lait*, 6 (51), 8-12.
- Fallou, H. (2024, 16 avril). Guide technique sur la mesure de turbidité et la concentration en matières en suspension : Précisions méthodologiques et application au réseau de mesure haute fréquence SyVEL.
- Feng, W., Wang, T., & Zhu, Y. (2023). Chemical composition, sources, and ecological effect of organic phosphorus in water ecosystems: a review. *Carbon Research*. <https://doi.org/10.1007/s44246-023-00038-4>.
- Flint, S. H., Palmer, J. S., Bloemen, K., Brooks, J. D., & Crawford, R. J. (2001). The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90(2), 151–157.
- Gomri, M. A., El Moulouk Khaldi, T., & Kharroub, K. (2018). Analysis of the diversity of aerobic, thermophilic endospore-forming bacteria in two Algerian hot springs using cultural and non-cultural methods. *Annals of Microbiology*, 68, 915-929.
- Google. (n.d.). [Vue satellite des sites de Hammam El Knif, Essalihine et Tamersit, Khenchela, Algérie]. Google Earth. Consulté le 12 avril 2025, à l'adresse

https://earth.google.com/web/@35.48732738,7.25265291,1017.1816227a,181.68028959d,35y,-0h,0t,0r/data=CgRCAggBOgMKATBCAggBSg0I_____ARAA.

- Guiraud, J. P. (1998). Techniques d'analyses microbiologiques. In: microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris, 576p : 168–333.
- Houha, B. (1996). Qualité des eaux de Khenchela : Étude hydro-chimique (Thèse de magistère, Université d'Annaba, Algérie). 120 p.
- International Organization for Standardization. (1984). Water quality — Determination of nitrite — Molecular absorption spectrometric method (ISO Standard No. 6777).
- International Organization for Standardization. (1984). Water quality — Determination of phosphorus — Part 1: Ammonium molybdate spectrometric method (ISO Standard No. 6878/1).
- International Organization for Standardization. (1984). Water quality — Determination of calcium content — EDTA titrimetric method (ISO Standard No. 6058).
- International Organization for Standardization. (1985). Water quality — Determination of electrical conductivity (ISO Standard No. 7888).
- International Organization for Standardization. (1988). Water quality — Determination of iron — Spectrometric method using 1, 10-phenanthroline (ISO Standard No. 6332).
- International Organization for Standardization. (1996). Water quality — Determination of ammonium — Part 1: Manual spectrometric method (ISO Standard No. 7150-1).
- International Organization for Standardization. (2016). Water quality — Determination of turbidity — Part 1: Quantitative methods 1 (ISO Standard No. 7027-1).
- ISO 7980:1986 – Qualité de l'eau — Dosage du calcium et du magnésium — Méthode par spectrométrie d'absorption atomique.
- Jean N., Guy Leyral., (2014). Microbiologie Technique : Dictionnaire des techniques. Edition 2014. Pp.239, 270, 283, 404.
- Joffin J.N., Leyral G., 2006. Microbiologie technique : dictionnaire de techniques. 4ème éd. Espagne : Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine.363 p.
- Khatri, N., & Rajvanshi, A. (2019). Hydrogeochemical characteristics and groundwater quality assessment in mineral-rich aquifers: A case study. Environmental Earth Sciences, 78(12), 345. <https://doi.org/10.1007/s12665-019-8415-0>.
- Kumar, S., Karan, R., Kapoor, S., S P, S., & S K, K. (2012). Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. Brazilian journal of microbiology. 43(4), 1595–1603. <https://doi.org/10.1590/S1517 838220120004000044>.

- Labгаа, S., & Labeled, H. (2018). Étude microbiologique appliquée sur des échantillons environnementaux [Mémoire de master, Université Ibn Khaldoun – Tiaret].
- Larpent, J.P. (1997). Mémento technique de microbiologie. 3^{ème} Ed. Technique et Documentation Lavoisier, Paris. Pp 910.
- Maragkoudakis P. A., Zoumpopoulou G., Miaris C., Kalantzopoulos G., Pot B. & Tsakalidou E. (2006). Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16(3), 189-199.
- Mehta, D., and Satyanarayana, T. (2013). Diversity of hot environments and thermophilic microbes. In T. Satyanarayana, J. Littlechild, and Y. Kawarabayasi (Eds.), *Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology: Biotechnology of thermophiles* (2nd ed., pp. 5–28 Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5899-5_1.
- Microbiologie Clinique. (2025, 15 avril). Coloration Vert de Malachite. <https://microbiologie-clinique.com/Coloration-Vert-de-Malachite.html>.
- Minic, Z., Serre, V., Hervé, G. (2006). Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *Comptes Rendus Biologies*, 329(7), 527-540.
- MIQUEL, P. 1879 Bull. de la Statistique municipale de Paris, Dec. 1879. Original not seen. Reviewed by TSIKLINSKY, M. P. 1899 Ann. Past. Inst., 13,788.
- Nas, F., Aissaoui, N., Mahjoubi, M., Mosbah, A., Arab, M., Abdelwahed, S., ... & Klouche-Khelil, N. (2021). A comparative GC–MS analysis of bioactive secondary metabolites produced by halotolerant *Bacillus* spp. isolated from the Great Sebkhah of Oran. *International Microbiology*, 24(3), 455-470.
- Olanrewaju, O.E., & Babalola, O.O. (2021). Production of Antimicrobial Compounds using Thermophilic Bacteria Species *Bacillus subtilis* and *Bacillus tequilensis*. https://www.researchgate.net/publication/355725962_Production_of_Antimicrobial_Compounds_using_Thermophilic_Bacteria_Species_Bacillus_subtilis_and_Bacillus_Tequilensis.
- Pardo-Esté, C., Cortés, J., Castro-Severyn, J., Pérez, V., Henriquez-Aedo, K., Cuadros, F., Yañez, C., Cuadros-Orellana, S., Dorador, C., & Molina, V. (2024). Secondary metabolites with antimicrobial activity produced by thermophilic bacteria from a high-altitude hydrothermal system. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1477458.
- Paul S. (1999). *Bactériologie*, 4^{ème} édition, 2^{ème} cycle. Dunod. Paris, P368-415.

- Paul Vos., George Garrity., Dorothy Jones., Noel R. Krieg., Wolfgang Ludwig., Fred A. Rainey., Karl-Heinz Schleifer., William B. Whitman. (2011). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. 2, illustrée edn. Volume 3. Springer Science & Business Media.
- Pentecost, A., Jones, B., & Renaut, R. W. (2003). What is a hot spring? *Canadian Journal of Earth Sciences*, 40(11), 1443–1446. <https://doi.org/10.1139/E03-083>.
- Praveen K.P., Preetam R.J., Nimal Christhudas I.V.S., Sagaya Jansi Murugan R., Agastian P., Arunachalam C., Sulaiman Ali Alharbi.,(2015).Screening Actinomycetes for Enzyme and Antimicrobial Activities from the Soil Sediments of Northern Tamil Nadu, South India. J.Taylor & Francis Groupe.2231-1866.
- Reiner, K. (2010, 11 novembre). Catalase test protocol. American Society for Microbiology. <https://asm.org/protocols/catalase-test-protocol>.
- Rodier, J., et coll. (2009). Dosage des nitrates. In *L'analyse de l'eau: Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer* (8e édition, p. 194). Dunod.
- Rodier, J., et coll. (n.d.). Dosage des sulfates. In *L'analyse de l'eau: Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer* (8e édition, p. 213). Dunod.
- Rodier, J., Legube, B., & Merlet, N. (2009). *L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer* (9e éd.). Paris : Dunod. ISBN 978-2-10-054179-9.
- Rodier, J., Legube, B., Merlet, N., & coll. (2009). *L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer* (9e éd., p. 107). Paris: Dunod. ISBN 978-2-10-054179-9.
- Rodier, J., Legube, B., Merlet, N., & coll. (2009). *L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer* (9e éd., p. 250). Paris: Dunod. ISBN : 978-2-10-054179-9.
- Rodier, J., Legube, B., Merlet, N., & Coll. (2009). *L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer* (9e éd., p. 168). Paris : Dunod. <https://www.algeria-educ.com/forum>.
- Rodier, J., Legube, B., Merlet, N., & Coll. (2009). *L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer* (9e éd., p. 166). Paris : Dunod. <https://www.algeria-educ.com/forum>.
- Rodier, J., Legube, B., Merlet, N., & Coll. (2009). *L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer* (9e éd., p. 249). Paris : Dunod. <https://www.algeria-educ.com/forum>.
- Rodier, J., Legube, B., Merlet, N., & Coll. (2009). *L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer* (9e éd.). Paris, France : Dunod.

- Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/35059215>.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91(4), 621–632. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.031>.
- Saibi H. 2009. Geothermal Resources in Algeria. *Renewable Energy* 13: 2544–2552.
- Sekuła, K., Rusiniak, P., Wątor, K., & Kmiecik, E. (2020). Hydrogeochemistry and related processes controlling the formation of the chemical composition of thermal water in Podhale Trough, Poland. *Energies*, 13(21), 5584. <https://doi.org/10.3390/en13215584>.
- Thaz, C. J., Lavanya, B., Kumar, J. P., & Jayaraman, G. (2015). Production and characterization of a halotolerant cellulase from *Bacillus aquimaris* VITP4 strain. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5, 412-424.
- Touaitia R, (2020). *Microbiologie générale* .02 :35-36.
- Williams, S. T., and Cross, T. (1971). Isolation, purification, cultivation and preservation of actinomycetes. *Methods Microbiol.* 4 : 295-334.
- Yakhlef, W., & Darbouche, A. (2012). Metabolic diversity of thermophilic bacteria from hot springs in Algeria. *J. Acad*, 2(1), 57-65.
- Zheng, Y. H., Liu, J., Ma, Y. Z., Xu, Y., Xu, F., & Hua, T. C. (2011). Temperature Effects on Enzyme Activity of Chicken Liver Esterase Used in Calorimetric Biosensor. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40(1–2), 125–131. <https://doi.org/10.3109/10731199.2011.611470>.

Annexes

Annexes :

➤ Annexe 01: Méthode de préparation des réactifs

L'ammonium :

1- réactif coloré (réactif 1) Dissoudre 130 g de salicylate de sodium et 130 g de citrate trisodique di hydrate dans l'eau contenue dans une fiole de 1000ml, ajouter 0,97 g de nitroprusiate de sodium et compléter à 1000ml avec de l'eau distillée. Cette solution est conservée dans un flacon en verre brun et stable au moins deux semaines.

2- solution de Dichloroisocyanurate de sodium (réactif 2) Dissoudre 32 g d'hydroxyde de sodium dans 500ml d'eau et laisser refroidir à température ambiante, ajouter 2 g de Dichloroisocyanurate di-hydraté, compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée. Cette solution est conservée dans un flacon en verre brun et stable au moins deux semaines.

3-Solution mère étalon d'ammonium 100 mg/l Dissoudre 0,297g de chlorure d'ammonium (séché à 105°C pendant au moins 2h) dans 1000 ml d'eau distillée. Cette solution est conservée dans un flacon en verre et stable au moins un mois.

4 -Solution fille étalon d'ammonium 1mg/l Prélever à l'aide une pipette 1ml de la solution étalon d'ammonium de 100mg/l. Verser dans une fiole de 100 ml et compléter au volume avec de l'eau distillée. Préparer cette solution le jour de l'emploi. La durée de conservation ne dépasse pas 24h.

5- solutions de lavage Dissoudre 100 g hydroxyde de potassium dans 100 ml d'eau distillée. Refroidir la solution et ajouter 900 ml d'éthanol 95%, Conserver dans un récipient en polyéthylène.

Nitrite :

1- réactif coloré Dissoudre 40 gr d' amino-4 benzène sulfonamide ($\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$) dans un mélange formé de 100ml d'acide orthophosphorique et de 500ml d'eau. Ajouter 2 gr de dichlorhydrate de N-(naphtyl-1) diamino-1,2 éthane ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2-2\text{HCl}$), compléter le volume à 1000 ml avec de l'eau distillée. Cette solution est stable pendant un mois si elle est conservée entre 2 et 5°C.

2 -Solution étalon mère de nitrites 100 mg/l Dissoudre 0,15 g de nitrite de sodium (séché à 105°C durant au moins 2 h) dans 1000 ml d'eau distillée Cette solution est stable pendant un mois si elle est conservée entre 2 et 5°C.

3- Solution étalon fille de nitrites 1 mg/l Prélever à l'aide d'une pipette 1ml de la solution étalon de nitrites de concentration 100 mg/l, la transvaser dans une fiole de 100ml et compléter au volume avec de l'eau distillée. Cette solution est préparée le jour de l'emploi.

Nitrate :

1- Solution de salicylate de sodium Dissoudre 0,5 g de salicylate de sodium (commerciale) dans 100 ml d'eau distillée. Cette solution est renouvelable toutes les 24 heures.

2- Solution de tartrate double de sodium et de potassium Dissoudre 400 g d'hydroxyde de sodium dans de l'eau distillée dans une fiole de 1000 ml, ajouter 60 g de tartrate double de sodium et potassium, laisser refroidir et compléter avec de l'eau distillée. La solution est conservée dans un flacon en polyéthylène à 4°C jusqu'à 1 mois.

3- Solution d'acide sulfurique Acide sulfurique concentré 96% de pureté (commerciale).

4- Solution d'hydroxyde de sodium à 30% Dissoudre 30 g d'hydroxyde de sodium dans 100 ml d'eau distillée.

5- Solution mère de nitrate de potassium à 100 mg/l de nitrate Dissoudre 0,722 g de nitrate de potassium anhydre dans 1000 ml d'eau distillée, ajouter 1 ml de chloroforme. La solution est conservée à 4°C plus de deux semaines.

6- Solution fille à 5 mg/l de nitrate Prendre 5 ml de la solution mère à 100 mg/l dans une fiole de 100 ml, compléter avec de l'eau distillée. La solution doit être renouvelée à chaque manipulation.

Sulfate :

1- Solution mère de sulfate de sodium, concentration 1 g/l Peser 1,479 g de sulfate de sodium (Na_2SO_4) dans une fiole jaugée de 1 000 ml et compléter jusqu'au trait de jauge. Cette solution se conserve 2 mois à l'abri de la lumière (flacon brun) à 4°C.

2- Solution stabilisante Dans une fiole jaugée de 1 000 ml, mettre 100 ml d'eau distillée. Ajouter 60ml d'acide chlorhydrique pur (densité 1,19) puis 200 ml d'éthanol, 150 g de

chlorure de sodium (NaCl) et 100 ml de glycérol. Compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée. Cette solution se conserve 2 semaines en flacon brun à 4 C.

3- Solution de chlorure de baryum, 0.01 N Peser 150 g de chlorure de baryum (BaCl₂), verser dans une fiole de 1000 ml et y ajouter 5 ml d'acide chlorhydrique pur. Compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Cette solution se conserve 2 semaines en flacon brun à 4 C.

Ortho phosphate :

1- Acide sulfurique (réactif mix) Préparation d'une solution d'H₂SO₄ de concentration $c = 9$ mol/l : Introduire 500 ml d'eau distillée dans un b cher de 2 litres, ajouter avec précaution, sous agitation continue, 500 ml d'acide sulfurique du commerce (densité e 1,84 g/ml, pureté supérieure à 97%).

Préparation d'une solution d'H₂SO₄ de concentration $c = 4,5$ mol/l: Introduire 500 ml d'eau distillée dans un b cher de 2 litres, ajouter avec précaution, sous agitation continue, 500 ml d'acide sulfurique de concentration 9 mol/l. Ces 2 préparations se conservent   4 C.

2- Acide ascorbique, solution à 100 g/l Dissoudre 10 g d'acide ascorbique (C₆H₈O₆) dans 100 ml d'eau distillée. Conserver dans une bouteille en verre foncé au réfrigérateur (4 C). Le réactif reste stable pendant 2 semaines, il peut cependant être utilisé ultérieurement tant qu'aucune coloration n'apparaît.

3- Heptamolybdate d'ammonium (réactif mix) Dissoudre 13 g d'heptamolybdate d'ammonium tetrahydrat  [(NH₄) MO₇C₂₄H₂O] dans 100 ml d'eau distillée, dissoudre 0,35 g de tartrate de potassium et d'antimoine h mihydrat  [K(SbO) C₄H₄O₆ 1/2 H₂O] dans 100 ml d'eau distillée. Mélanger ces deux solutions. Ajouter à ce mélange, tout en agitant, 300 ml de la solution d'acide sulfurique à 4,5 mol/l. Ce réactif doit être conservé à 4 C dans une bouteille en verre brun, il est stable pendant au moins 2 mois.

4- Solution mère de PO₄³⁻ de concentration 100 mg/l Sécher quelques grammes de dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄) Jusqu'à masse constante, à 105 C ( tuve).

Dissoudre 0,143 g de KH₂PO₄ sec dans 800 ml environ d'eau distillée contenue dans une fiole jaugée de 1000 ml. Ajouter 10 ml de solution d'acide sulfurique à 4,5 mol/l et compléter au volume avec de l'eau distillée. Conserver dans un flacon en verre bien bouché, cette solution est stable pendant au moins 1 mois au réfrigérateur (4 C).

5- Solution fille de PO_4^{3-} à 2 mg/l A l'aide d'une pipette, verser 2 ml de la solution mère de PO_4^{3-} (concentration 100 mg/l) dans une fiole jaugée de 100 ml, compléter au volume avec de l'eau distillée et homogénéiser. Préparer cette solution le jour de l'emploi. La durée de conservation ne dépasse pas 24h.

Calcium :

1- Hydroxyde de sodium, solution 2 N Dissoudre 8 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) dans 100 ml d'eau distillée, conserver dans une bouteille en polyéthylène.

2- calcium, solution de référence à 100 mg/l Une solution mère de commerce titrisol à 1 g/l en calcium peut être utilisée. Préparation de la solution fille à 100 mg/l de calcium:

Introduire 5 ml de la solution mère à 1 g/l de calcium à l'aide d'une pipette dans une fiole jaugée de 50 ml. Ajuster avec de l'eau distillée. On obtient une solution de concentration 100 mg/l.

3- EDTA, solution titrée 0,01 mol/l Sécher une portion d'EDTA à 80°C pendant 2 heures (étuve), dissoudre ensuite 3,725 g du sel sec dans de l'eau distillée et diluer à 1000 ml.

Conserver la solution d'EDTA dans une bouteille en verre et en vérifier le titre de temps à autre (fréquence hebdomadaire), comme suit (détermination du facteur de correction).

Calcul du coefficient de correction f_c : Prendre 50 ml de la solution de référence calcium (cf. 6.2.2). S'en servir pour titrer la solution d'EDTA en versant lentement l'EDTA jusqu'au virage au violet. Lorsque la coloration violette est obtenue, noter le volume d'EDTA versé. Le facteur de correction f_c est égal à : $f_c = \text{Volume versé} / \text{Volume théorique (12.5 ml)}$

Si: $0,96 \leq f_c \leq 1,04$, alors la solution d'EDTA est utilisable pour le dosage.

4- indicateur: Murexide

Chlorure :

1- Solution de nitrate d'argent 0,02 mol/l Cette solution est obtenue comme suit. Dissoudre dans de l'eau distillée 3,397 g de nitrate d'argent (AgNO_3), séchés au préalable à l'étuve à 105°C pendant 2 heures, et compléter (avec de l'eau distillée) à 1000 ml dans une fiole jaugée.

2- Chromate de potassium (indicateur) On réalise une solution à 10% comme suit. Dissoudre dans de l'eau distillée 10 g de Chromate de potassium K_2CrO_4 et compléter à 100 ml.

3- Solution référence de chlorure de sodium 0,02 mole/l On réalise cette solution comme suit. Dissoudre dans de l'eau distillée 1,1688 g de chlorure de sodium (Na Cl), séchés au préalable à l'étuve à $105^{\circ}C$ pendant 2 heures, et compléter à 1000 ml dans une fiole jaugée.

4- Solution d'acide nitrique à 0,1 mole/l Solution du commerce. Utilisée pour réajuster un pH supérieur à 9,5.

5- Solution d'hydroxyde de sodium 0,1 mole/l Solution prête à l'emploi. Utilisée lorsque le pH est inférieur à 5 pour le réajuster.

6 -Carbonate de calcium($CaCO_3$) ou mono hydrogénocarbonate de sodium ($NaHCO_3$) en poudre Ces réactifs sont utilisés lorsque le pH est inférieur à 5 pour le réajuster (solution tampon).

Fer :

Tous les réactifs seront préparés à partir d'eau distillée exempte de toutes traces de fer.

1- Solution d'acide chlorhydrique à 10% Diluer 10 ml de HCl à 1.12 g/ml dans une fiole de 100 ml et compléter avec l'eau distillée.

2- Solution de Peroxodisulfate de potassium à 40 g/l Dissoudre 4 grammes de Peroxodisulfate de potassium (K_2SO_4) dans l'eau distillé et complété à 100 ml. Cette solution est stable pendant une semaine.

3- Solution de chlorhydrate d'hydroxylamine à 100 g/l Dissoudre 10 g de chlorhydrate hydroxylamine ($NH_2OH.HCL$) dans l'eau distillé et compléter à 100 ml. Cette solution est stable pendant une semaine.

4- Solution de phénantroline-1,10 Dissoudre 0.5 g de chlorure de phénantroline 1.10 monohydrate ($C_{12}H_{10}N_2O$) dans l'eau distillé et complété à 100 ml. Cette solution est stable pendant une semaine si elle est conservée à l'obscurité.

5-Solution tampon acétate Dissoudre 40 g d'acétate d'ammonium (CH_3COONH_4) dans l'eau, ajouter 50 ml d'acide acétique cristallisable (CH_3COOH) et complété à 100 ml.

6- Solution mère de fer correspondant à 1 g/l Cette solution peut être préparé à partir d'ammonium fer (II) sulfate hexa hydraté $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. appelé sel de Mohr. 0.7022 g dans 100 ml d'eau distillé.

7-Solution intermédiaire (fille) de fer correspondant à 10 mg/l Diluer 10 ml de la solution mère à 1 g/l dans une fiole de 1000 ml et compléter avec l'eau distillée.

Matière Organique :

1- Acide sulfurique (H_2SO_4 ; $\rho = 1.84 \text{ g/ml}$. 18 mol/l)

2- Acide sulfurique, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 7.5 \text{ mol/l}$: Ajouter lentement et sous agitation continue, 420 ml d'acide sulfurique (a) à 500 ml d'eau distillée. Laisser refroidir et compléter à 1000 ml.

3-Acide sulfurique, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2 \text{ mol/l}$: Dans une fiole de 1000 ml, ajouter lentement et sous agitation continue, 110 ml d'acide sulfurique (a) à environ 500 ml d'eau. Laisser refroidir et compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.

4- Oxalate de sodium $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$. Solution mère de concentration 0,05 mol/l : Sécher à l'étuve l'oxalate de sodium à 120°C pendant 2heures. Dissoudre 6,7 g d'oxalate séché dans de l'eau distillée et compléter à 1000ml dans une fiole jaugée. Cette solution est stable pendant 6 mois si elle est stockée à l'obscurité (flacon brun) à 4°C .

5- Oxalate de sodium $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$. Solution étalon de concentration 5 millimoles/l : Dans une fiole jaugée de 1000 ml. Introduire 100 ml de la solution mère d'oxalate de sodium (d). Compléter au volume avec de l'eau distillée et agiter. Cette solution titrée est stable pendant 2 semaines si elle est stockée à l'obscurité (flacon brun) à 4°C .

6-Permanganate de potassium KMnO_4 . Solution mère. Concentration 20 millimoles/l Dissoudre avec de l'eau distillée 3.2 g de KMnO_4 dans une fiole jaugée de 1000 ml et porter au trait avec de l'eau distillée. Chauffer à $90-95^\circ\text{C}$ pendant 2 heures. Refroidir et stocker pendant au moins 2 jours. Transvaser et stocker dans une bouteille sombre en évitant de prendre le culot. La solution est stable 3 mois à température ambiante.

7-Permanganate de potassium KMnO_4 Solution titrante de concentration 2millimoles/l Dans une fiole jaugée de 1000 ml. Introduire 100 ml de la solution mère (f),

compléter au volume avec de l'eau distillée et agiter. Cette solution est stable au moins deux, stockée dans un flacon brun et à 4°C.

8-Résorcinol, solution mère (1 g/l) : Dans une fiole jaugée de 1000 ml, dissoudre 1,00 g de résorcinol dans environ 500 ml d'eau distillée. Porter au trait avec de l'eau distillée. La solution est stable pendant 2 mois à température ambiante.

9-Résorcinol, solution de contrôle qualité (1,0 mg/l) : Dans une fiole jaugée de 1000 ml. Diluer 1 ml de la solution mère de résorcinol (1g/l) dans environ 500 ml d'eau distillée. Porter au trait avec de l'eau distillée. La solution est à préparer extemporanément.

TAC et TA :

1- Acide chlorhydrique (HCl) concentré à 37%.

2- Solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 0.01 N : Diluer 0,82 ml de l'acide chlorhydrique concentré à 37% (a) et compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.

➤ **Annexes 02:**

Composition des milieux de culture et solutions :

Milieu	La composition
Bouillon Nutritif (pH = 7,2 ± 0,2)	Peptone 20g, Extrait de levure 5 g, Chlorure de sodium 5 g, Eau distillée 1000 ml .
Gélose Nutritive (pH = 6,8 à 7,4)	Peptone 5 g, Extrait de viande 10 g, Extrait de levure 2 g, Chlorure de sodium 5 g, Agar 20 g, Eau distillée 1000 ml.
Gélose viande-foie (pH = 7,6)	Extrait de viande 10g, Peptone 20g, Extrait de levure 10g, Glucose 5g, Agar 15g, Eau distillée 1000 ml.
Gélose Müller Hinton (pH = 7,4)	Infusion de viande de bœuf 300g, Hydrolysate de caséine 17,5g, Amidon 1,5g, Agar 17g, Eau distillée 1000 ml.
Gélose à amidon	Gélose nutritive 150ml, Amidon 1,5 g.
Gélose à gélatine	Gélose nutritive 150ml, Gélatine 1,5g.
Gélose au lait	Lait écrémé 75 ml, Gélose Nutritive 75 ml.
Gélose à la cellulose	Gélose Nutritive 150 ml, Cellulose 1g.
Gélose au tween 80	Gélose Nutritive 150 ml, Tween 80 1,5 ml.
Gélose au jaune d'œuf	Gélose Nutritive 150 ml, Emulsion de jaune d'œuf 15 ml.
Gélose à xylose	Gélose Nutritive 150 ml, xylose 1g.
Gélose à la bile esculine	Gélose Nutritive 150 ml, Bile esculine 5,6 g.

