

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

ⵍⵓⵎⵓⵔ ⵎⵎⵎⵔ ⵉⵎⵎⵓⵔ ⵉⵏ ⵔⵉⵣⵉ ⵓⵣⵣⵓ



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie-Microbiologie

## Mémoire de fin d'études

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologies

Spécialité: Biotechnologie Microbienne

### Contribution à la caractérisation physico-chimique et microbiologique des eaux thermales d'Assif El Hammam à Bejaïa

Organisme d'accueil: **Laboratoire Central de la Police Scientifique de Ben Aknoun (LCPS)**

Présenté par: Melle **MOUHOUB Ferroudja**  
Melle **NAIT KACI Karina**  
Mr **SAIT Mohamed**

Soutenu publiquement, le 13/07/2023, devant le jury composé de:

|     |                     |                  |              |                      |
|-----|---------------------|------------------|--------------|----------------------|
| Mme | <b>DERMECHE S.</b>  | <b>MCB</b>       | <b>UMMTO</b> | <b>Présidente</b>    |
| Mr  | <b>BOUACEM K.</b>   | <b>MCA</b>       | <b>UMMTO</b> | <b>Promoteur</b>     |
| Mme | <b>ZERROUKI K.</b>  | <b>Ingénieur</b> | <b>LCPS</b>  | <b>Co-promotrice</b> |
| Mme | <b>BERROUANE N.</b> | <b>MAA</b>       | <b>UMMTO</b> | <b>Examinatrice</b>  |

Année universitaire: 2022/2023

# Remerciements

*Tout d'abord, nous remercions DIEU, le tout puissant, de nous avoir donné la foi, le courage, la patience et la volonté nécessaire afin de mener ce modeste travail, fruit d'un labeur de longues années d'études.*

*C'est avec un très grand plaisir que nous remercions infiniment notre promoteur **Mr BOUACEM K.**, Maîtres de Conférences Classe A à la Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques (FSBSA), qui nous a accordé l'honneur de diriger ce travail. Qu'il trouve en ces mots toute notre gratitude, et nos sentiments de reconnaissances, pour sa confiance en nous, sa générosité et son engagement durant ces années.*

*Vous avez été bien plus qu'un simple enseignant dans notre parcours, vous êtes devenu comme un père, un frère et un ami. Nous sommes tellement reconnaissants d'avoir eu la chance de vous avoir comme guide et mentor.*

*Vous avez su créer une atmosphère d'apprentissage stimulante et inspirante dans votre classe, vos cours étaient bien plus qu'une simple transmission de savoir, vous avez su susciter notre curiosité, éveiller nos passions pour l'apprentissage, nous savons que peu importe où nous nous dirigeons dans l'avenir, nous porterons toujours avec nous les valeurs que vous nous avez transmis.*

*Avec toute notre gratitude,*

*Nos vifs remerciements s'adressent **Mr ADJRAD M.**,*

*Chef par intérim de l'administration générale de la police scientifique et technique, pour son accueil chaleureux et sa grande bienveillance.*

*Nous exprimons notre gratitude sincère envers **Mr BENAYAD T.**, responsable du laboratoire de sécurité alimentaire et environnement, de nous avoir chaleureusement accueillis dans le laboratoire de la police scientifique et d'avoir généreusement mis à notre disposition le matériel et les produits essentiels à notre étude.*

*Nos sincères remerciements vont aussi à notre co-promotrice **Mme ZERROUKI K.** pour sa contribution, ses conseils et sa gentillesse.*

*Nous exprimons notre gratitude envers **Mr MEFTALI D.** pour son soutien constant, son assistance permanente et précieuse et sa présence à nos côtés tout au long de notre stage.*

*Un grand merci pour tous les membres du laboratoire de Sécurité Alimentaire et Environnement.*

*Nous remercions nos enseignants qui nous ont suivis durant ces cinq années et nous ont transmis toutes les connaissances nécessaires à notre apprentissage.*

*Nous tenons également à exprimer notre grande considération aux membres du jury qui ont accepté d'examiner notre travail:*

***Mme DERMECHE S.**, Maître de Conférences Classe B à la FSBSA, qui nous a fait l'honneur de présider le jury.*

***Mme BERROUANE N.**, Maître Assistante Classe A à la FSBSA, qui a eu l'amabilité d'être notre examinatrice.*

*Enfin, un grand merci à tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail.*



# Dédicace

*Au nom de Dieu le tout puissant  
J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail*

*À ma très chère **maman Mounira**, autant de phrases aussi expressives sans elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi je sais combien tu as sacrifié juste pour me donner un brillant avenir. Je connais les nombreuses nuits que tu n'as pas dormis, les nombreuses vacances que tu n'as pas prises et les nombreuses choses que tu n'as pas achetées pour que je puisse avoir la vie que j'ai en ce moment. J'apprécie tout ce que tu fais pour moi maman, ce travail est un témoin de ta patience.*

*À mon très cher **Papa Djamel**, autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes sont-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance, tu m'as donné une si belle vie, entourée d'amour et d'attention. Je profite de toutes ces merveilleuses bénédictions et de tout le confort grâce à ton travail acharné et à ton engagement tu as toujours été près de moi, pour m'écouter, me soutenir, me suivre et m'encourager. J'apprécie tout ce que tu fais papa, puisse ce travail diminuer ta souffrance et te porte bonheur lognue vie à toi mon héros.*

*À mon précieux **frère Ghiles**, à tous les moments d'enfance passés avec toi mon frère, en gage de ma profonde estime pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu m'as soutenu, réconforté et encouragé. Puissent nos liens fraternels se consolider et se pérenniser encore plus.*

*À ma petite **sœur Céline**, mon petit ange qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille je t'aime très fort.*

*À mes **grands-parents**, que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que dieu vous préserve et vous donne santé et longue vie. Je vous aime tellement.*

*À mes chers (es) **tantes et oncles**,*

*Merci à tous mes oncles et tantes particulièrement, **HADJI Mouhamed, CHAOUI Lynda, BELMEHDI Samir, HADJI Assia, Amghar Alloua** je n'aurais pas assez de mots pour vous remercier pour votre soutien et votre gentillesse. Que vous trouvez ici l'expression de mon infinie reconnaissance et de mon profond respect.*

*Et bien évidemment Cette thèse ne saurait pas ce qu'elle est sans l'aide de ma chère tante **Hadji Nawel** je ne te remercie jamais assez et les mots ne suffiront pas pour t'exprimer mes sentiments de reconnaissances pour ta disponibilité ta serviabilité et ta patience tout au long de ma vie.*

*Je remercie mes chers petits cousins, **Amazigh, Melissa, Zahra, Nelia, Adam et Nadine** pour les bons moments que je passe avec vous, pour votre énergie et votre amour pour moi.*

*Merci à vous chers amis(es) **Lamia, Karina, Mohamed**. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement.*

Ferroudja





## Dédicace

*Au nom de Dieu le tout-puissant  
J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail*

*À ma très chère **maman**, à celle qui m'a donné la vie, à ma chère mère **KARIMA**, qui m'a entouré d'amour, d'affection et qui fait tout pour ma réussite, tu es mon école, mon enseignante, ma conseillère et mon soutien continu, ce modeste travail est le fruit de ton encouragement de tant d'années aucune phrase ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi, tu es la personne la plus gentille, la plus douce et la plus adorables au monde. Merci **maman**, je t'aime.*

*À mon cher père **AHMED**, grand homme, qui m'a aidé à devenir cette femme que je suis aujourd'hui, tu as toujours été un exemple dans ma vie, un père respectueux, honnête et responsable. Je tiens à honorer l'homme que tu es, grâce à toi **papa** j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité, ton soutien fut une lumière dans mon parcours, ce modeste travail est le fruit de ton encouragement, de tes sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation, ta générosité, ta compréhension et surtout ton amour, je te remercie énormément pour tout ce que tu as fait pour moi. Je t'aime **papa** et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une longue et heureuse vie.*

*À ma charmante sœur **NADJAT** et mes chers frères **AMARA** et **ILYANE** pour leur affection, compréhension, aide et patience. C'est l'occasion pour moi de vous remercier très sincèrement.*

*À mon cher mari **MOURAD**, pour la patience, les conseils et le soutien dont il a fait preuve pendant toute la durée de ce travail, pour l'encouragement et l'aide qu'il m'a toujours accordé, toutes mes affections et mes gratitude pour toi.*

*À toutes ma famille : mon grand-père, ma grand-mère, mes oncles, mes tante, cousins, cousines qui m'ont soutenues de près ou de loin je vous remercie pour tout et en particulier mon oncle **NAIT'KACI MANSOUR** et sa femme **HOURIA** pour l'aide qu'ils m'avaient fournis.*

*À monsieur **HELAF SADAK** et sa femme **AIT'KACI GHANIA** et leurs fils **LOUNIS** et **SARAH** qui m'ont accueillis chaleureusement chez eu pendant toute la période de stage pratique à Alger et pendant le mois sacré du ramadan, passer ce dernier loin de sa famille et se sentir à l'aise comme si j'étais chez moi ça prouve que vous êtes une famille adorable et généreuse, un grand merci pour votre bienveillance pour moi merci d'avoir été là quand j'avais plus besoin de vous, votre compagnie m'a été très bénéfique et très chère, toute ma reconnaissance pour vous.*

*Et aussi à mon trinôme et chers amis **FERROUDJA** et **MOHAMED**, avec lesquels j'ai passé les moments les plus beaux et sans eux ce travail ne serait pas possible, et je le dédie également à tous mes amis qui m'ont encouragé.*

Karina





# Dédicace

*Au nom de Dieu le tout- puissant*

*J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail*

*À ma très chère **maman**.*

*Au moment de rédiger ces mots de remerciements, je me rends compte à quel point il est difficile d'exprimer toute ma gratitude envers toi. Tu es une source inépuisable d'amour, de soutien et d'inspiration, et je tiens à te dire à quel point je suis reconnaissant d'avoir une maman aussi incroyable que toi. Ma reconnaissance et mon respect sont infinis. Je t'aime plus que tout.*

*À mon très cher **père**, qui a toujours été avec moi dans les bons et mauvais moments. Que ce travail tu fais honneur et te comble de fierté.*

*À ma très chère sœur aînée **Lydia**, qui m'a beaucoup encouragée à aller de l'avant, je te dis aujourd'hui grand merci grande sœur pour ce que tu as fait et continues de faire pour moi, je t'aime du profond de mon cœur, et je suis impatient de partager avec toi de nombreux autres moments de bonheur et de réussite*

*À mes très chères petites sœurs*

*À mon grand- père que j'aime tant.*

*À Mes très chers amis et camarades tout au long de mon parcours universitaire qui sont comme des frères **Younes, Kaci, El Hadi***

*Vous m'avez offert une épaule sur laquelle m'appuyer, une oreille attentive pour écouter mes préoccupations et des conseils avisés pour m'aider à avancer. Vous étiez là pour moi dans les moments de doute et d'incertitude, m'encourageant à croire en moi-même et à ne jamais abandonner. Alors que je continue mon chemin, je garderai en moi les souvenirs précieux que nous avons partagés. Je serai là pour vous de la même manière que vous l'êtes pour moi, prêt à vous offrir mon soutien et ma gratitude sans fin.*

*Je vous aime*

*A vous aussi cher **Hocine et Ahmed**, je vous souhaite plein de réussites dans votre vie*

*À mes très chers amis **HAMZA.BOUREN et ZAKARIA Mendjfi et Mohamed KENZI** qui m'ont énormément aidé tout au long de mon stage Lorsque les défis et les difficultés semblaient insurmontables, vous m'avez tendu la main sans hésitation. Vous m'avez offert votre amitié sans réserve et vous m'avez apporté un réconfort inestimable.*

*À mon adorable et meilleur trinôme **Ferroudja et Karina**, merci pour votre confiance et la bonté qui est sans limites.*

*À Tous ceux qui ont cru en moi et m'ont soutenu.*

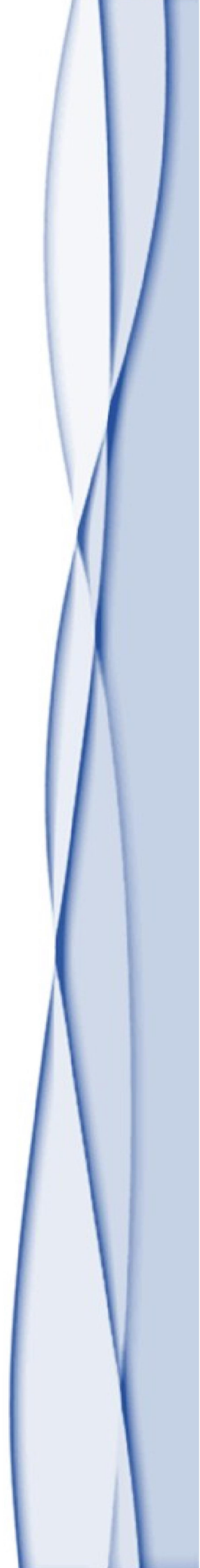
*À tous ceux qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail.*

*À vous cher lecteur.*

*Mohamed*



# *Table des matières*



|                    |   |
|--------------------|---|
| Remerciements      |   |
| Dédicaces          |   |
| Table des matières |   |
| Liste des figures  |   |
| Liste des tableaux |   |
| Introduction.....  | 1 |

## Synthèse bibliographique

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>I</b>   | <b>Notion sur les écosystèmes chauds.....</b>                 | <b>3</b>  |
| <b>II</b>  | <b>Source thermique.....</b>                                  | <b>3</b>  |
| 1          | Définition et composition.....                                | 3         |
| 2          | Origine.....  | 4         |
| 3          | Classification des eaux thermales.....                        | 4         |
| 4          | Exemple de sites hydrothermaux terrestres dans le monde.....  | 7         |
| 5          | Sources thermales algérienne.....                             | 8         |
| 6          | Microorganismes thermophiles.....                             | 9         |
| 6.1        | Thermophilie.....   | 9         |
| 6.2        | Mécanismes d'adaptation aux hautes températures.....          | 10        |
| 6.3        | Biodiversité taxonomique et métabolique des thermophiles..... | 11        |
| 6.3.1      | Arbre du vivant.....  | 11        |
| 6.3.2      | Microorganismes des sites hydrothermaux terrestres.....       | 12        |
| 7          | Adaptation moléculaire à la thermophilie.....                 | 13        |
| 7.1        | Stabilité des protéines.....                                  | 13        |
| 7.2        | Stabilité des acides nucléiques.....                          | 13        |
| 7.3        | Stabilités de la membrane cytoplasmique.....                  | 14        |
| <b>III</b> | <b>Intérêt des thermophiles en biotechnologie.....</b>        | <b>14</b> |
| 1          | Thermoenzymes.....  | 15        |
| 1.1        | Définition.....   | 15        |
| 2          | Production des biopolymères.....                              | 19        |
| 3          | Avantage des thermophiles.....                                | 19        |

## Matériel et méthodes

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
|            | <b>Cadre de l'étude.....</b>            | <b>21</b> |
| <b>I</b>   | <b>Site d'étude.....</b>                | <b>21</b> |
| <b>II</b>  | <b>Matériel.....</b>                    | <b>22</b> |
| 1          | Matériel biologique.....                | 22        |
| 2          | Matériel non biologique.....            | 22        |
| <b>III</b> | <b>Méthodes.....</b>                    | <b>22</b> |
| 1          | Échantillonnage.....                    | 22        |
| 2          | Analyses physico-chimique des eaux..... | 22        |

## Table des matières

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.1   | Mesure du potentiel d'hydrogène.....  | 22 |
| 2.2   | Mesure de la conductivité électrique.....   | 23 |
| 2.3   | Mesure de la turbidité.....   | 23 |
| 2.4   | Détermination des résidus secs.....   | 23 |
| 2.5   | Détermination du taux d'oxygène dissous par électrochimie.....  | 23 |
| 2.6   | Mesure de la résistivité.....   | 24 |
| 2.7   | Dosage des anions et cations.....   | 24 |
| 2.7.1 | Dosage du calcium par la méthode titrimétrique.....   | 24 |
| 2.7.2 | Dosage des chlorures par la méthode de Mohr.....  | 24 |
| 2.7.3 | Dosage des sulfates( $\text{SO}_4^{-2}$ ), nitrites( $\text{NO}_2^{-}$ ), nitrates ( $\text{NO}_3^{-}$ ), ammoniums ( $\text{NH}_4^{+}$ ) et phosphates ( $\text{PO}^{-3}$ )..... | 24 |
| 2.7.4 | Recherche des métaux lourds par spectrophotométrie d'absorption atomique.....   | 25 |
| 2.7.5 | Dosage de l'arsenic par colorimétrie.....   | 25 |
| 3     | Analyse bactériologique des échantillons d'eau.....   | 26 |
| 3.1   | Méthode de filtration.....  | 26 |
| 3.2   | Recherche et dénombrement des germes.....   | 26 |
| 4     | Purification et caractérisation des souches isolées.....  | 30 |
| 4.1   | Etude morphologique.....  | 30 |
| 4.1.1 | Observation macroscopique.....  | 30 |
| 4.1.2 | Observation microscopique.....  | 30 |
| 4.2   | Étude des caractères biochimiques.....  | 30 |
| 4.3   | Étude des caractéristiques physiologiques.....  | 30 |
| 4.3.1 | Influence du pH sur la croissance.....  | 31 |
| 4.3.2 | Influence de la température sur la croissance.....  | 31 |
| 4.3.3 | Influence de la salinité sur la croissance.....   | 31 |
| 4.4   | Criblage d'activités enzymatiques.....  | 31 |

### Résultats et discussions

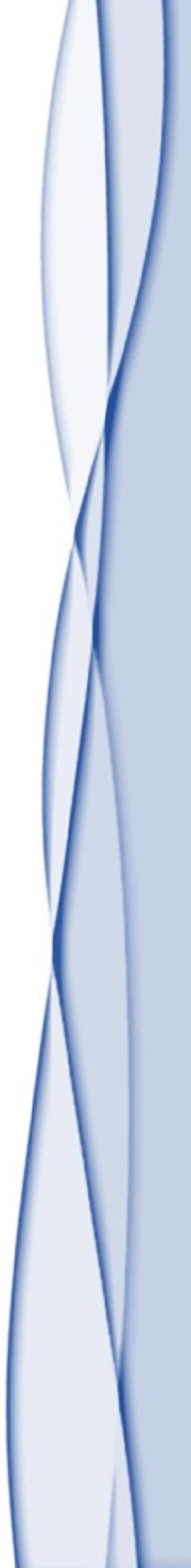
|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>I</b>  | <b>Résultat de l'analyse physico-chimique de l'eau.....</b>                                   | <b>33</b> |
| 1         | Appréciation de la qualité organoleptique de l'eau.....                                       | 33        |
| 2         | Résultats des paramètres physico-chimiques de l'eau.....                                      | 33        |
| 3         | Résultats de dosage des anions et des cations.....  | 34        |
| 4         | Résultats de la Recherche des métaux lourds par spectrophotométrie d'absorption atomique..... | 34        |
| <b>II</b> | <b>Résultat de l'analyse bactériologique de l'eau.....</b>                                    | <b>35</b> |
| 1         | Résultats de l'analyse de la qualité sanitaire.....   | 35        |
| 2         | Résultats de la caractérisation des souches.....  | 36        |
| 2.1       | Études morphologique.....   | 36        |
| 2.1.1     | Examen macroscopique.....   | 36        |
| 2.1.2     | Examen microscopique.....   | 38        |
| 2.2       | Caractérisation biochimique et métabolique.....   | 40        |
| 2.3       | Caractérisation physiologique des souches bactériennes.....                                   | 40        |

## Table des matières

---

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>III</b> | <b>Mise en évidence de l'activité enzymatique.....</b> | <b>45</b> |
|            | <b>Conclusion et perspectives.....</b>                 | <b>50</b> |
|            | <b>Références bibliographiques.....</b>                | <b>51</b> |
|            | <b>Annexes</b>   |           |
|            | <b>Résumé</b>  |           |
|            | <b>Abstract</b>  |           |

# *Liste des figures et tableaux*



|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figure 1:</b>  | Schéma simplifié de la circulation hydrothermale.....                                   | 4  |
| <b>Figure 2:</b>  | Exemple des biotopes naturels chauds.....   | 7  |
| <b>Figure 3:</b>  | Localisation des principales sources géothermique du Nord Algérien.....                 | 9  |
| <b>Figure 4:</b>  | Effet de la température sur le taux de croissance de microorganismes.....               | 10 |
| <b>Figure 5:</b>  | Arbre phylogénétique du vivant d'après Woese modifié par Stetter (2006)...              | 11 |
| <b>Figure 6:</b>  | Localisation géographique de la source thermale d'Assif El Hammam.....                  | 21 |
| <b>Figure 7:</b>  | Aspect macroscopique de quelques souches isolées.....                                   | 36 |
| <b>Figure 8:</b>  | Observation à l'état frais des souches.....   | 38 |
| <b>Figure 9:</b>  | Observation de quelques souches après la coloration de Gram au GX100.....               | 38 |
| <b>Figure 10:</b> | Résultats de la culture des souches à une concentration de 1% de NaCl.....              | 43 |
| <b>Figure 11:</b> | Résultats de la culture des souches à une concentration de 3% de NaCl.....              | 43 |
| <b>Figure 12:</b> | Résultats de la culture des souches à une concentration de 7% de NaCl.....              | 43 |
| <b>Figure 13:</b> | Résultats de la culture des souches à une concentration de 9 et 11% de NaCl             | 44 |
| <b>Figure 14:</b> | Résultats de la culture des souches à pH 5.....   | 44 |
| <b>Figure 15:</b> | Résultats de la culture des souches à pH 9.....   | 44 |
| <b>Figure 16:</b> | Mise en évidence de l'activité enzymatique chez les souches isolées.....                | 47 |
| <b>Figure 17:</b> | Étude quantitative de la capacité des souches isolées dans la production d'enzymes..... | 48 |
| <b>Figure 18:</b> | Étude du type d'enzyme secrétée par les isolats.....                                    | 48 |

## Liste des tableaux

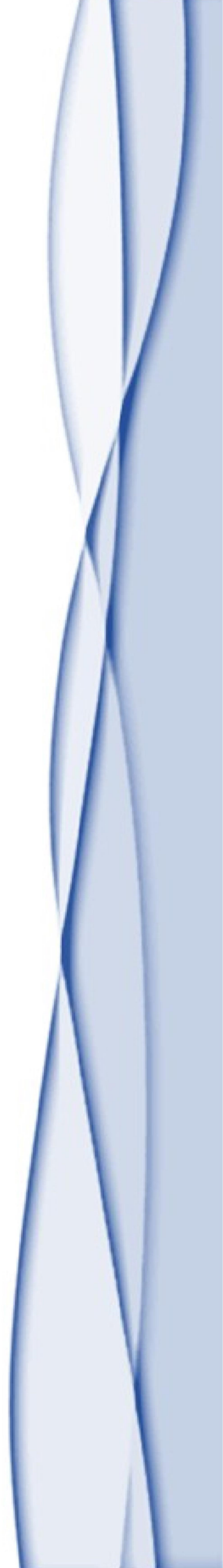
---

|                      |   |    |
|----------------------|---|----|
| <b>Tableau I:</b>    | Classification des eaux thermales.....  | 6  |
| <b>Tableau II:</b>   | Exemple de quelques sources thermales dans le monde.....  | 8  |
| <b>Tableau III:</b>  | Exemple de quelques sources thermales Algériennes.....  | 9  |
| <b>Tableau IV:</b>   | Sites de prélèvements de l'eau et du sol.....   | 22 |
| <b>Tableau V:</b>    | Germes recherchés dans l'eau thermales et l'argile.....   | 26 |
| <b>Tableau VI:</b>   | Techniques utilisées pour la recherche des germes.....  | 28 |
| <b>Tableau VII:</b>  | Résultats de l'analyse physicochimique.....   | 33 |
| <b>Tableau VIII:</b> | Résultats de la composition minérale des échantillons d'eau analysés....                                    | 34 |
| <b>Tableau IX:</b>   | Résultats du dosage des métaux lourds.....  | 34 |
| <b>Tableau X:</b>    | Résultats de l'analyse microbiologique des eaux de Assif El Hammam..  | 35 |
| <b>Tableau XI:</b>   | Caractères macroscopiques des souches isolées.....  | 37 |
| <b>Tableau XII:</b>  | Résultats d'étude microscopique à l'état fixé des isolats bactériens.....                                   | 39 |
| <b>Tableau XIII:</b> | Résultats de l'influence de la température, la salinité et le pH sur la croissance des souches isolées..... | 42 |
| <b>Tableau XIV:</b>  | Résultats des activités enzymatiques recherchées.....   | 46 |

### Annexes

|                   |   |
|-------------------|---|
| <b>Tableau A:</b> | Matériels et appareillages utilisées  |
| <b>Tableau B:</b> | Les cations recherchés et leurs réactifs                                      |
| <b>Tableau C:</b> | Tableau de lecture de la galerie API 20E                                      |
| <b>Tableau D:</b> | Tests biochimiques effectués pour l'identification des souches isolées.       |
| <b>Tableau E:</b> | Résultat de la galerie API 20E des souches isolées des eaux d'Assif El Hammam |

# *Introduction*



Le monde regorge de sites à activité volcanique qui peuvent être retrouvés même sous la mer. Ces régions volcaniques offrent une variété d'environnement dite extrême pour les microorganismes archéens et bactérie extrémophiles. Un environnement est qualifié d'extrême lorsque les paramètres physico-chimiques qu'il renferme sont le plus souvent hostiles à la vie conduisant en une spécialisation et/ou une diminution de la biodiversité existante: pH inférieur à 5 ou supérieur à 9, pression supérieure à 20 mégapascal (MPa), température supérieure à 50°C ou inférieure à 10°C, et des concentrations en sels supérieures à 3-4 % en NaCl jusqu'à saturation (35 % en NaCl). Ces habitats sont occupés particulièrement par les principaux groupes d'extrémophiles qui sont les psychrophiles, les thermophiles, les acidophiles, les alcaliphiles, les halophiles et enfin les piézophiles. Les exemples les plus flagrants de ces environnements extrêmes sont les sources chaudes de surfaces terrestres.

L'Algérie est un pays riche par sa diversité géologique et écologique et compte plus de 280 sources thermales dont certaines sont exploitées pour leurs bienfaits notamment thérapeutiques. Les extrémophiles nichant les sources chaudes sont considérées comme les descendants vivants les plus proches des premières formes de vie sur terre. Par conséquent, ces sources donnent un aperçu de l'origine et de l'évolution de la vie. De plus, les thermophiles et les hyperthermophiles permettent la compréhension de la plage de température qui définit les limites de la vie. Ces microorganismes de l'extrême ont développé des mécanismes d'adaptations uniques aux températures élevées et représentent des bio-ressources importantes pour les enzymes et des processus thermostables ce qui les rend si- importants pour la biotechnologie.

Au cours des deux dernières décennies, les sources chaudes sont devenues le centre d'attention de la communauté scientifique et un sujet irremplaçable et attractif. Les chercheurs se sont de plus en plus concentrés sur la grande diversité des microorganismes des sources thermales naturelles pour explorer les avantages des thermophiles dans les domaines industriels et biotechnologiques.

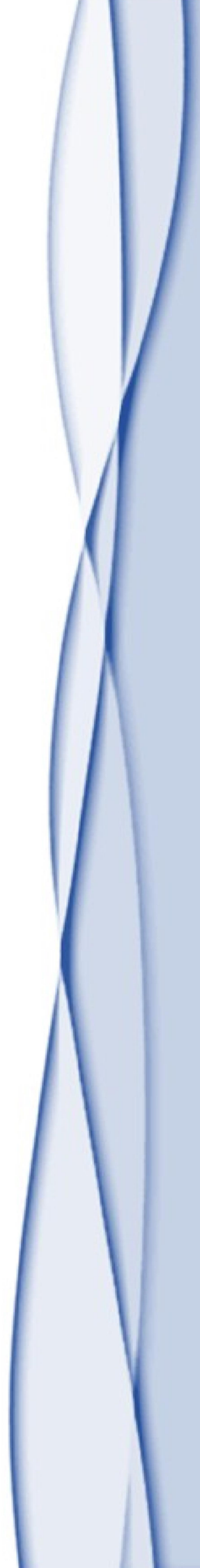
De nombreuses enzymes microbiennes sont utilisées comme alternative à l'hydrolyse chimique de différentes matières premières dans les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques. Les enzymes issues de microorganismes thermo-tolérants et thermophiles sont particulièrement intéressantes en raison de leur activité enzymatique élevée dans un large éventail de conditions physico-chimiques, leur stabilité thermique élevée et aussi la production de ces enzymes est simple, économiquement et réalisable.

Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressés à l'étude physico-chimique, l'évaluation de la qualité sanitaire et l'isolement des bactéries de la source thermale d'Assif El Hammam dans la wilaya de Bejaia. Également, une étude morphologique, physiologique biochimique et métabolique a été effectuée pour l'ensemble des souches isolées et un criblage de leurs activités enzymatiques extracellulaires.

En effet, les travaux réalisés au cours de ce mémoire au laboratoire centrale de la police scientifique nous ont permis de répondre à certaines préoccupations concernant la composition physico-chimique et la qualité sanitaire de notre eau ainsi que la connaissance de la biodiversité microbienne que cette eau héberge notamment les bactéries thermophiles à intérêt biotechnologique.

Ce manuscrit comporte trois grandes parties: une synthèse bibliographique basée sur la connaissance des écosystèmes chauds en particulier les sources thermale dans le monde et en Algérie et quelques rappels de notions de bases et définitions concernant les microorganismes thermophiles, leur biodiversité taxonomique et métabolique leurs modes d'adaptations ainsi leur intérêt biotechnologiques. Nous mettrons la lumière aussi sur les enzymes ou thermoenzymes produites par ces organismes thermophiles. La partie expérimentale est réalisée au laboratoire central de la police scientifique de Ben Aknoun et au laboratoire pédagogique de microbiologie à la Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques. Elle comportera matériel et méthodes, résultats et discussion. Le document sera clos par une conclusion et quelques perspectives.

*Synthèse  
bibliographique*



## I. Notion sur les écosystèmes chauds

Les environnements chauds sont des biotopes extrêmes dans lesquels vivent les thermophiles. Ces biotopes sont généralement d'origine naturelle mais peuvent avoir une origine artificielle. Les microorganismes qui colonisent des habitats géothermiques naturels sont largement répandus sur notre planète, ils sont souvent associés à des zones tectoniques actives volcaniques ou géothermiques qui comprennent les fumerolles terrestres ou les solfatares, les geysers et les sources chaudes terrestres, des sources hydrothermales, océaniques profondes. Ces écosystèmes sont les plus connus pour abriter une variété considérable de microorganismes thermophiles (**Satyanarayana et al., 2013**). Ils sont également retrouvés dans des biotopes artificiels chauds comme les canalisations domestiques d'eau chaude, le compost, les bioréacteurs...etc. (**Ferrera et Reysenbach, 2007**).

Selon **Johnson et al. (2003)**, ces écosystèmes peuvent avoir une origine:

- **Géothermique terrestre:** la nature de l'eau va dépendre des roches traversées et elle est généralement associée à une activité volcanique; la température de l'eau in situ sera fonction de la profondeur d'origine pour atteindre des températures inférieures à 100°C et des pH acides ou basiques à la surface de la terre. C'est le cas des sources chaudes localisées en Islande, aux Açores ou encore dans le Parc national de Yellowstone. Les biotopes géothermiques, bien que constituant une part minime de l'hydrothermalisme, ont été les plus étudiés.
- **Hydrothermale océanique profonde:** le fluide hydrothermal jaillit au niveau du plancher océanique au travers de fumeurs noirs où le liquide sort à des températures variant de 20 à 400°C selon la localisation.
- **Pétrolière:** certains de ces gisements pétroliers sous-marins et continentaux sont situés entre 1,5 et 4 km de profondeur et présentent des températures allant de 60 à 130°C et des pH généralement neutres.

## II. Sources thermales

Les sources thermales sont des environnements naturels présents partout dans le monde et leur utilisation représente une ressource socio-économique ayant un impact sur les applications médicales et de bien-être de *sanus per aquam* (SPA). Des équilibres physico-chimiques et microbiologiques caractérisent ces niches écologiques et leurs connaissances sont essentielles pour définir les propriétés de l'eau et soutenir une gestion appropriée (**Valeriani et al., 2018**).

### 1. Définition et composition

Les eaux thermales sont des émanations d'eau de vapeur provenant de zones profondes qui lorsqu'elles atteignent les couches superficielles se refroidissent et se condensent, donnant naissance à des eaux de températures très élevées. Dans certains cas la vapeur d'origine magmatique rencontre sur son chemin ascendant des manteaux aquifères souterrains et transforme leurs eaux en eaux thermales.

Bien que ces sources soient fréquentes dans les zones volcaniques, elles peuvent jaillir aussi dans des aires présentant des valeurs du degré géothermique supérieur à la normale (José-Miguel *et al.*, 1989).

Selon le journal officiel de la république Algérienne **JORA (2007)**, les eaux thermales sont des eaux captées à partir d'une émergence naturelle ou d'un forage qui en raison de la nature spéciale de leurs principes, de la stabilité de leurs caractéristiques physiques et de leurs compositions chimiques, peuvent avoir des propriétés thérapeutiques.

### 2. Origine

Schématiquement, au niveau du cycle de l'eau à l'échelle du globe terrestre: 60% de l'eau de pluie reste dans l'atmosphère et maintient le d'évapotranspiration, 15% ruisselle rejoint les cours d'eaux, 25% s'infiltrate dans le sol et alimente les nappes souterraines.

Une partie infime de ces eaux va percoler jusqu'à une importante profondeur (-2000m) pour former les eaux minérales, dont certaines d'entre elles alimenteront les thermales (Figure 1).

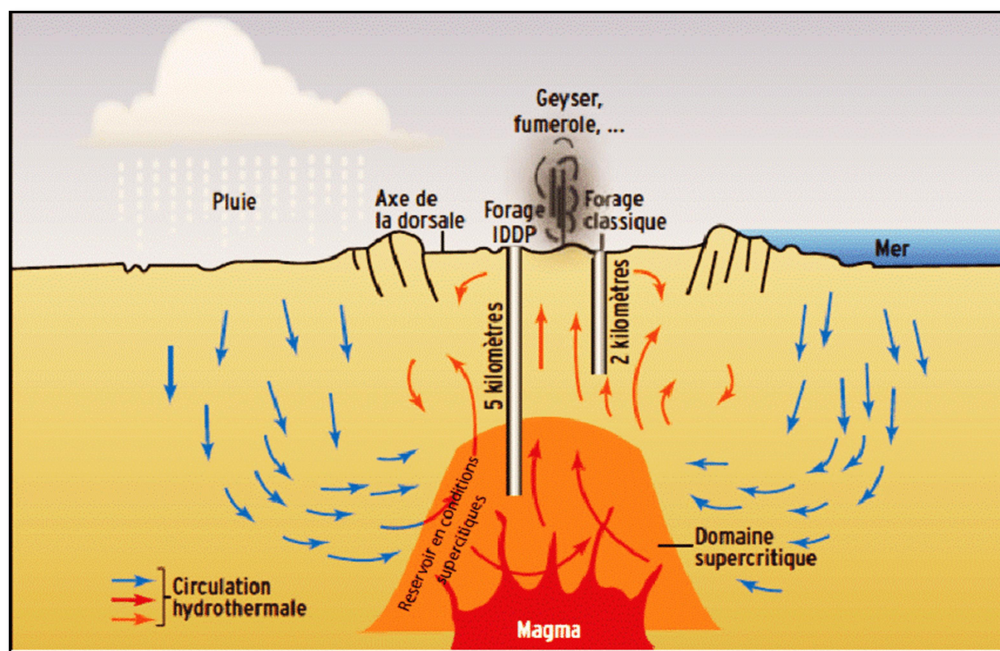


Figure 1: Schéma simplifié de la circulation hydrothermale [1].

### 3. Classification des eaux thermales

Les sources thermales sont classées de diverses manières et selon différents critères. Cette classification se fait selon trois paramètres: La température d'émergence, la composition minérale et la conductivité électrique (Tableau I).

Les éléments les plus fréquemment retrouvés dans une eau thermo-minérale sont:

- Des gazs: oxygène, azote, dioxyde de carbone et hydrogène sulfuré.
- Des sels minéraux: chlorures, sulfates, calcium, magnésium, sodium, potassium...etc.
- Des oligo-éléments: cuivre, zinc, arsenic, bore, brome, fer, manganèse et autres.

**Tableau I: Classification des eaux thermales (Vieville, 1983; Issaadi, 1992; Athamena, 2006; Duriez, 2006).**

|  |   |   |  |  |
|--|---|---|--|--|
| <p><b>Eaux froide</b><br/>Moins de 20°C</p>        | <p><b>Eaux magmatique</b><br/>Eaux avec un débit constant en composition et en température.</p> | <p><b>Bicarbonatée:</b> Eaux de basse minéralisation, alcalines et froides, présente une forte concentration en bicarbonate.</p> <p><b>Sodique:</b> La présence de sodium dans les eaux thermales est liée à l'apport salifère à partir des formations évaporitique.</p> <p><b>Calcique:</b> Elle est influencée par la dissolution carbonatées possèdent des propriétés anti-inflammatoires.</p> <p><b>Chlorurée:</b> Les eaux chlorurées ou eaux salines possèdent des propriétés proches de celles de l'eau de mer. Chargées en chlorure de calcium, Elles sont utilisées en rhumatologie et en neurologie.</p> <p><b>Sulfatée:</b> Ces eaux se caractérisent par leurs températures et minéralisation qui sont variables. Elles peuvent être classées comme: Sodiques et magnésiques.</p> <p><b>Arsenicale:</b> L'arsenic existe naturellement sous forme de sulfure dont le trioxyde d'arsenic est le plus dominant.</p> | <p><b>Source d'eau acide</b><br/>pH inférieur à 7</p>  | <p><b>Classe 1</b><br/>Une conductivité inférieure à 2000 us/cm.</p>           |
| <p><b>Eaux hypothermales</b><br/>21 à 35°C</p>     |   |   | <p><b>Source d'eau neutre</b><br/>pH égale à 7</p>   | <p><b>Classe 2</b><br/>Une conductivité comprise entre 2000 et 7000 us/cm.</p> |
| <p><b>Eaux mésothermales</b><br/>35 à 45°C</p>     |   |   | <p><b>Eaux tellurique</b><br/>Leur débit les suit la saison puisqu'il provient de l'infiltration des pluies.</p> | <p><b>Source d'eau alcaline</b><br/>pH supérieur à 7</p>                       |
| <p><b>Eaux Hyperthermales</b><br/>plus de 45°C</p> |   |   | <p><b>Classe 4</b><br/>Une conductivité supérieure à 15000 us/cm.</p>  |  |

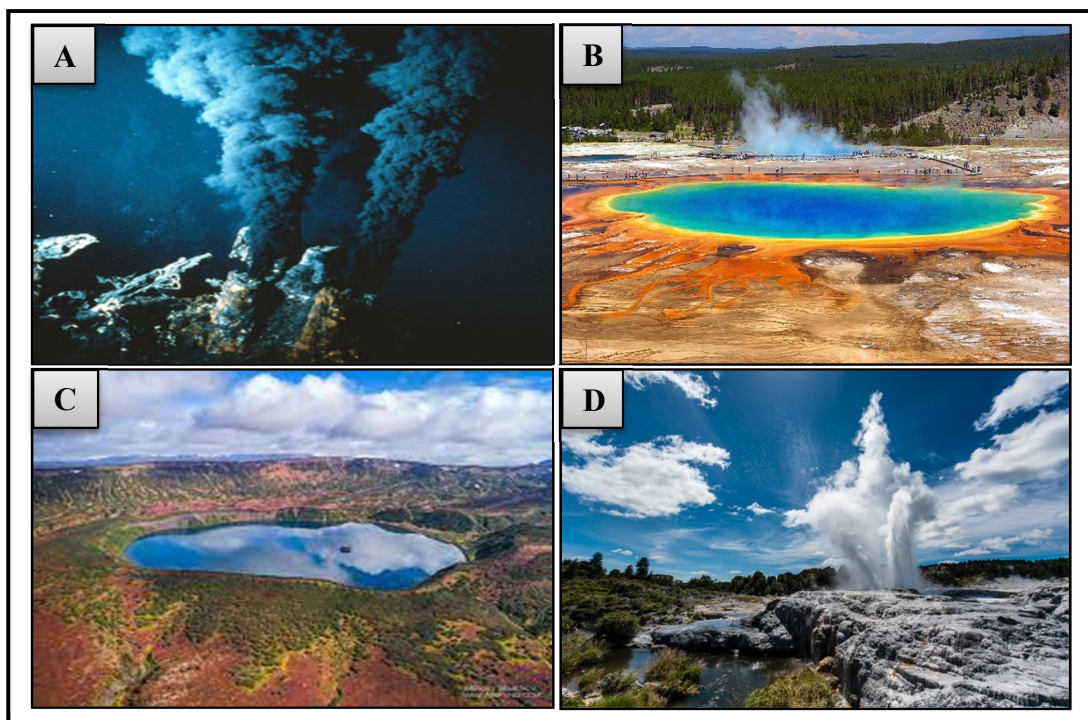
### 4. Exemple de sites hydrothermaux terrestres dans le monde

Les sources thermales sont distribuées sur l'ensemble de la planète: en Eurasie, en Amérique du Nord et du Sud, en Afrique, Australie, Océanie, et dans l'Antarctique. Dans la **figure 2** sont citées quelques sources thermales dans le monde. Ces sources sont concentrées dans certaines régions plus que d'autres (**Hussein et al., 2017**).

Les sources thermales sont fréquentes, les plus connues sont situées dans les zones volcaniques, telles que la Caldeira de Yellowstone, la Nouvelle-Zélande et l'Islande, là où on les trouve en abondance (**Amarouche-Yala et al., 2015**).

La zone du globe connaissant la plus grande concentration des sources thermales est constituée par le parc national de Yellowstone aux Etats Unis où *Thermus aquaticus* produisant la Taq polymérase a été découverte (**Madigan et Martinko, 2007**).

Ces écosystèmes ont été classés selon leurs températures qui est naturellement variable d'une source à une autre (**Tableau II**), ce qui est à l'origine d'une biodiversité microbienne très importante (**De Castro et al., 2016**).



**Figure 2: Exemples de biotope naturels chauds. A.** Fumeur noir dans l'océan Atlantique[2], **B.** Source d'eau chaude, parc de Yellowstone[3], **C.** Uzon Caldera (Russie) [4], **D.** Gyser pohutu (nouvelle zeland) [5].

**Tableau II: Exemples de quelques sources thermales dans le monde (Hug et *al.*, 2014; Menzel et *al.*, 2015).**

| Sources chaudes | Localisation     | Température en °C |
|-----------------|------------------|-------------------|
| Yellowstone     | U.S.A            | 92                |
| Champagne pool  | Nouvelle Zélande | 45-75             |
| Geyser Pohutu   | Nouvelle Zélande | 80-100            |
| Krisuvik        | Islande          | 90                |
| Uzon caldera    | Russie           | 61-64             |

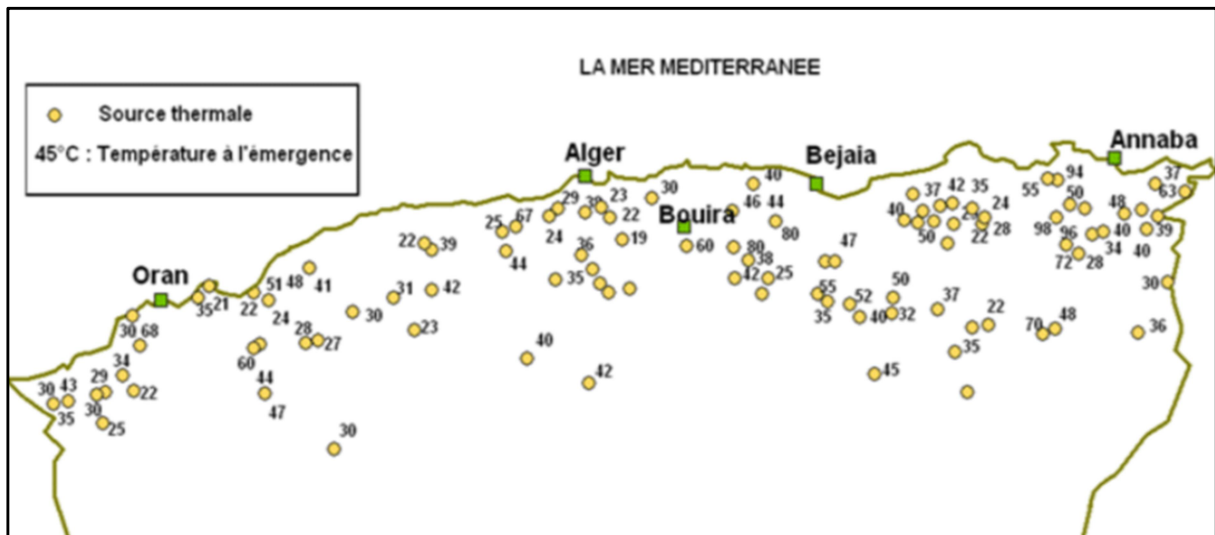
### 5. Sources thermales algériennes

En étant le plus grand pays de la région méditerranéenne et du Nord-africain avec une surface de 2,382 millions Km<sup>2</sup>, l'Algérie est dotée d'un potentiel géothermique considérable, caractérisé par la présence de nombreuses stations d'eaux thermo-minérales réparties sur l'ensemble de son territoire. Ces sources thermales sont non seulement très abondantes mais aussi très riches dans leur composition chimique notamment en minéraux (Saibi, 2015).

En effet, plus de 280 sources thermales ont été répertoriées avec des températures allant de 18°C à 98°C (*in* Bouacem et *al.*, 2022). Un tiers de ces prodigieuses sources ont des températures supérieures à 45°C (Benziada, 2022). Selon Saibi (2015), ces sources sont distribuées sur les quatre coins du pays et leur nombre augmente au fur et à mesure que l'on se rapproche de la région Nord (Figure 3). Parmi ces sources, les majeures et les plus populaires sont: Hammam Meskhoutine (H. Debagh) et Hammam Guergour à l'Est, Hammam Bouhanifia, Hammam Bouhadjar, Hammam Bougharara et Hammam Righa à l'Ouest ainsi que Assif El Hammam au Sud (Tableau III) (Fekraoui et Kedaid, 2005).

Ces sources thermales sont des habitats écologiques qui hébergent une importante communauté bactériennes aérobies thermophiles, possédant des propriétés bénéfiques et prometteuses du point de vue biotechnologique (Bouacem et *al.*, 2014; Bouanane et *al.*, 2016). L'importance accordée à la température et/ou à la composition des eaux jaillissantes de ces sources explique leur large exploitation en balnéothérapie et médecine thermique; ce qui est une tradition ancestrale bien connue en Algérie (Amarouche-Yala et *al.*, 2015).

Au mépris des études intensives sur la multiformité microbienne des sources chaudes terrestres à travers le monde, les sources thermales algériennes restent très peu étudiées, excepté quelques rares études récentes sur les bactéries thermophiles isolées de certaines sources (Benammar et *al.*, 2020; Bouacem et *al.*, 2022).



**Figure 3: Localisation des principales sources géothermiques du Nord Algérien (Fekraoui et Abouriche, 1999).**

**Tableau III: Exemples de quelques sources thermales algériennes (Ait Ouali et al., 2019; Fekraoui et Kedaid, 2005).**

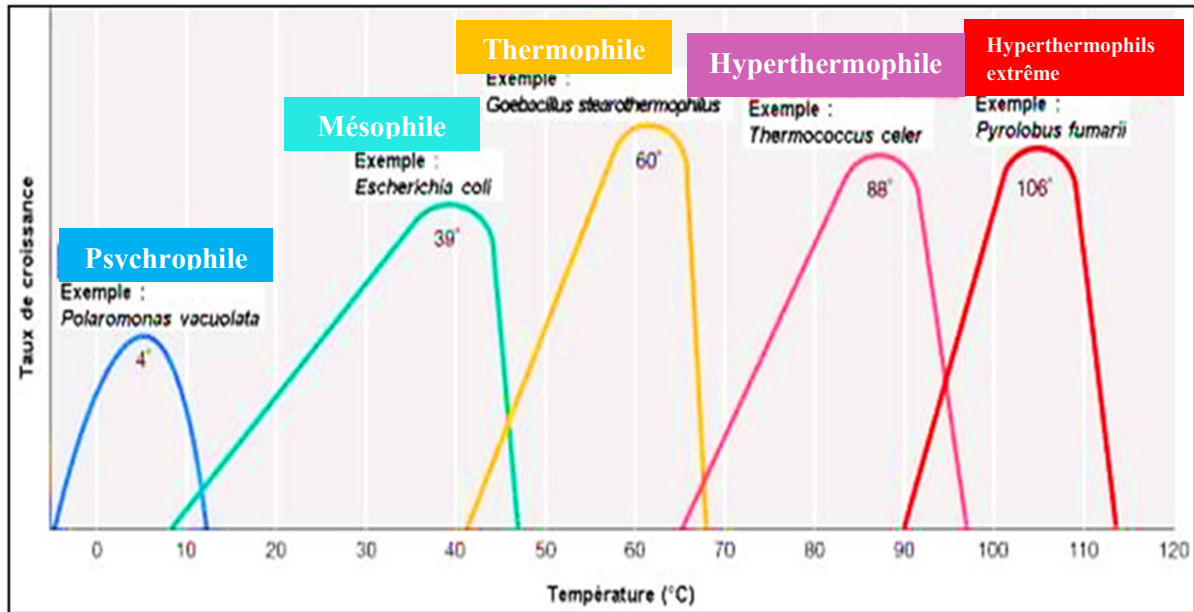
| Sources thermales  | Localisation      | Température °C |
|--------------------|-------------------|----------------|
| Assif El Hammam    | Bejaia            | 45             |
| Hammam Maskhoutine | Guelma            | 95-98          |
| Hammam Guergour    | Sétif             | 44             |
| Hammam Bouhanifia  | Mascara           | 68             |
| Hammam Bouhadjar   | Ain Timouchent    | 65             |
| Hammam Boughrara   | Tlemcen           | 45             |
| Hammam Righa       | Ain Defla         | 68             |
| Hammam Salihine    | Biskra            | 70             |
| Hammam El Biban    | Bordj Bou Arreidj | 80             |
| Hammam Ain Mentila | Relizane          | 32             |

## 6. Microorganismes thermophiles

### 6.1. Thermophile

La température est une variable importante dans chaque écosystème. Elle a été considérée en biologie comme un élément de base de classification. De ce fait, quatre groupes majeurs sont définis selon les températures optimales de croissance: les psychrophiles qui ont une température optimale de croissance basse, les mésophiles ayant une température optimale moyenne, les thermophiles ayant une température optimale élevée et les hyperthermophiles ayant une température optimale très élevée (**Figure 4**). La vie aux températures élevées est classée en forme thermophiles ou hyperthermophiles.

Les thermophiles sont des microorganismes qui se développent à des températures relativement élevées, entre 45°C et 80°C. Les hyperthermophiles qui sont des thermophiles particulièrement extrêmes pour lesquelles les températures optimales sont au-delà de 80°C (Madigan et Martinko, 2007).



**Figure 4: Effet de la température sur les taux de la croissance de microorganismes: psychrophiles, mésophiles, thermophiles, hyperthermophiles et hyperthermophiles extrêmes (Madigan et Martinko, 2007).**

### 6.2 Mécanismes d'adaptation aux hautes températures

Les températures élevées constituent une réelle menace pour les microorganismes. En effet, la chaleur peut dénaturer les enzymes, les macromolécules cellulaires et la bicouche lipidique qui composent la membrane cytoplasmique de ces germes (Vavitsas et al., 2022). De ce fait, Les thermophiles doivent mettre en places un ensemble de mécanismes adaptatifs et une stabilité des fonctions physiologiques dans des conditions de température extrême (Sang et al., 2020). Pour ce faire, leur principal composant, notamment, les protéines, les acides nucléiques, et les lipides doivent être résistants à la chaleur, par conséquent, ils ont connu diverses adaptations au cours de leurs évolutions, qui leur permettraient de se conserver dans telles températures (Satyanarayana et al., 2013). Les éléments qui confèrent une plus haute tolérance aux thermophiles sont:

- Membranes cellulaires riches en acides gras saturés qui deviennent plus rigides;
- ADN gyrases reverse qui protègent l'ADN contre la dénaturation;
- Protéines chaperonnes pour le maintien du bon repliement des protéines;
- Protéines thermostables;
- Un contenu élevé en bases G et C.

De plus, leur résistance exceptionnelle s'explique par leur capacité à engager des interactions électrostatiques et des propriétés physiques pour maintenir leurs activités à des températures élevées et à leurs capacités de conserver leur configuration et leur fonctionnement à des températures extrêmes (Dumorné et al., 2017). Enfin, une bonne sécrétion d'enzymes capables d'effectuer des fonctions catalytiques optimales à haute température est essentielle pour que les thermophiles s'adaptent aux conditions de températures élevée (Sang et al., 2020).

## 6.3 Biodiversité taxonomique et métabolique des thermophiles

Comme la plupart des écosystèmes dans lesquels évolue l'homme, les eaux thermales ne sont pas stériles, elles sont l'habitat d'une flore bactérienne dont la physiologie dépendent des caractères physico-chimiques de l'environnement: Température, pH, potentiel redox des eaux, présence de composés organiques ou inorganiques (Capdepuuy, 1985; Capdepuuy et al., 1996).

### 6.3.1 Arbre du vivant

Les études phylogénétiques basées sur l'analyse de l'ARN ribosomal ont révélé l'existence de trois domaines distincts de la vie sur terre. Ces domaines sont les bactéries (*Bacteria*), Archées (*Archaea*) et les eucaryotes (*Eucarya*). En ce qui concerne les microorganismes thermophiles, ils peuvent effectivement appartenir aux deux domaines de la vie, à savoir Bacteria et Archaea. Les archées thermophiles, en particulier, sont connues pour prospérer dans des environnements extrêmement chauds. Ces microorganismes thermophiles sont présents dans les branches les plus profondes de l'arbre du vivant tel qu'il a été proposé par Woese (Figure 5).

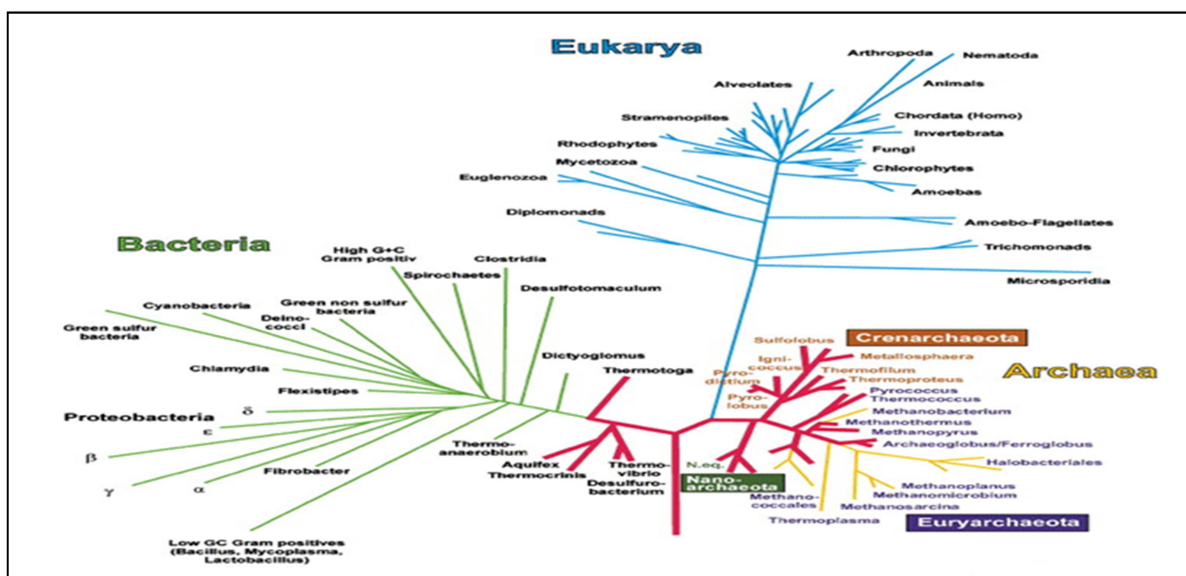


Figure 5: Arbre phylogénétique du vivant d'après Woese modifié par Stetter (2006) (les hyperthermophiles sont en trait rouge)

### a) *Bacteria*

Les bactéries thermophiles du domaine *Bacteria* présentent une grande variété de caractéristique physiologique et métabolique. Elles comprennent des organismes phototrophes chimiolithotrophes, autotrophes et hétérotrophes. Nous ne citons que quelques-unes :

Le phylum des *Actinobacteria* englobe des bactéries Gram positive avec une teneur élevée en guanine plus cytosine (G+C) dans leur génome. Les actinobactéries thermophiles sont distribués dans divers niches écologiques, mais elles sont présentes en très grandes quantités dans les matières organiques en décomposition tels que le compost, la bagasse (**Goodfellow et Williams, 1983; Ensign et al., 1993**). Par contre, elles semblent être absentes dans les sources thermales chaudes d'origine volcanique (**Xu et al., 1996; Hwang et al., 2001**). Les actinobactéries thermophiles appartiennent principalement au genre: *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Thermomonospora* et *Thermoactinomyces* (**Song et al., 2001**).

Les cyanobactéries également appelées (algues bleues), sont connu pour leurs capacités à coloniser les environnements extrêmes tels que les sources chaudes. Ces microorganismes capables de tolérer des températures élevées beaucoup mieux que les algues eucaryotes et les bactéries photosynthétique anoxygénique, ce qui leur confèrent un avantage compétitif dans ces environnements uniques.

### b) *Archaea*

Chez les *Archaea* thermophiles et hyperthermophiles, il existe deux principaux phyla : Les *Crenarchaeota* et les *Euryarchaeota*, en plus de ces deux derniers, quatre autres ont été caractérisés et inclus parmi les *Archaea*: *Thaumarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Korarchaeota* et *Aigarchaeota* (**Hacène, 2016**). Les *Crenarchaeota* sont pour la plupart des hyperthermophiles métabolisant le soufre. Les *Euryarchaeota* ont une diversité de microorganismes au niveau de leur morphologie, leurs habitats mais aussi dans leur physiologie.

### 6.3.2 Microorganismes des sites hydrothermaux terrestres

La découverte des organismes thermophiles a bouleversé une idée très répandue dans l'époque de Pasteur chez les biologistes (et les microbiologistes en particulier). Selon laquelle les organismes meurent tous au-delà de 80°C. Or, la découverte des organismes vivants bien au-delà de cette limite supposée dans les sites thermaux.

Plusieurs nouvelles espèces d'*Archaea* et de bactéries ont été isolées de ces écosystèmes telles que:

- ✓ *Pyrobaculum caldifontis* isolée par **Amo et al.** en 2002 aux Philippines.
- ✓ *Desulfotomaculum solfataricum* isolée par **Goorissen et al.** en 2003 aux Etats-Unis d'Amérique.
- ✓ *Sulfurihydrogenibium azorense* isolée par **Aguiar et al.** en 2004 à l'Azores.

- ✓ *Thermosediminibacter litoriperuensis* isolé par **Lee et al.** en 2005 au Pérou.
- ✓ *Gracilibacter thermotolerans* isolée par **Lee et al.** en 2006 aux USA.
- ✓ *Thiobacillus sajanensis* isolée par **Dul’Steva et al.** en 2007 au niveau de hammam El Biban à Oran (Algérie).
- ✓ En 2010, **Khelifi et al. (2010)** ont pu identifier et caractériser un nouveau genre, *Microaerobacter* avec l’espèce type *Microaerobacter geothermalis*, isolée de la source thermale de Hammam Sidi Jdidi à Nabeul en Tunisie. Cette espèce est chimioorganotrophe et capable d’utiliser une grande variété de composés organiques.
- ✓ **Steinsbu et al. (2011)**, ont pu isoler et caractériser un nouveau genre de la famille des Thermaceae (*Rhabdothermus*), à partir de la cheminée hydrothermale Soria Moria dans la dorsale médio-océanique de l’Arctique.
- ✓ En 2012, une nouvelle espèce du genre *Deinococcus* (*Deinococcus sahariens*) a été isolée à partir de la source thermale du Jemna à Kebli en Tunisie (**Bouraoui et al., 2012**).
- ✓ *Thermoactinomyces kenchelensis* a été isolée d’une source thermale à Khenchela (Algérie). La température optimale de croissance de cette nouvelle espèce se situe entre 37 et 55°C (**Mokrane et al., 2016**).
- ✓ *Nonomuraea thermotolerans* a été isolée à partir d’un compost de champignons en chine (**Wu et Liu, 2016**).
- ✓ **Liu et al. (2016)** ont pu isoler 58 actinobactéries thermophiles à partir de plusieurs sources chaudes en Chine.

## 7. Adaptation moléculaire à la thermophilie

### 7.1 Stabilité des Protéines

Les protéines des thermophiles présentent des caractéristiques spécifiques qui sont à l’origine de leur thermostabilité et le maintien de leur fonction à haute température. En effet, les microorganismes thermophiles ont fait évoluer ces protéines dans le but de maintenir leur fonction à des températures extrêmes. La stabilité thermique des protéines est renforcée par des réseaux supplémentaires de liaisons hydrogène (**Vavitsas et al., 2022**) et par l’augmentation de la formation de liaisons disulfure ou le transfert d’une structure monomérique à une structure oligomérique (**Satyanarayana et al., 2013**). Les régions de surface des protéines thermophiles ont moins d’acides aminés polaires, non chargés et plus d’acides aminés chargés, ce qui procure un nombre plus élevé de ponts salins intramoléculaires (**Mehta et al., 2016**). La diminution de la longueur des boucles de surface et l’augmentation du nombre de liaisons ioniques entre les acides aminés basiques et acides et leur intérieur très hydrophobe, rend la protéine plus résistante au déploiement (**Vavitsas et al., 2022**).

### 7.2 Stabilité des acides nucléiques

L’ADN des thermophiles détient sa stabilité thermophile de plusieurs facteurs qui peuvent se combiner, tels des niveaux élevés d’ADN gyrase inverse, qui augmente fortement

le nombre de liens topologiques entre les deux brins de la molécule d'ADN ce qui empêche la dénaturation (Declais, 1997). De plus, des histones ou d'autres protéines de liaisons à l'ADN. Les polyamines jouent un rôle dans la stabilité de l'ADN et la stabilité d'autres macromolécules (Satyanarayana et al., 2013). Les hyperthermophiles contiennent jusqu'à dix copies de leurs génomes, ce qui peut aisément faciliter la réparation d'ADN par recombinaison homologue (Jaenicke et Sterner, 2006).

### 7.3 Stabilité de la membrane cytoplasmique

Les membranes cytoplasmiques des bactéries hyperthermophiles sont composées d'une bicouche lipidique formée d'acide gras liés à un glycérol par une liaison ester et sont exceptionnellement riches en acides gras saturés. Cette richesse a comme conséquence une hydrophobicité plus forte ce qui permet d'augmenter la température de fusion de la membrane tout en maintenant une stabilité et une fluidité optimales. Ces membranes présentent le premier rempart de défense chez les microorganismes thermophiles (Vavitsas et al., 2022). La tolérance à la chaleur des thermophiles est contrôlée par ces membranes qui jouent le rôle de barrière de perméabilité, en ajustant le flux entrant et sortant, mais aussi grâce à la stabilité chimique de leurs lipides membranaires dans des gammes de températures assez élevées (Mehta et al., 2016). Ces températures augmentent la fluidité de ces membranes et pour la maintenir, les cellules doivent réguler la composition lipidique quantitativement et qualitativement, de ce fait, les thermophiles contiennent plus d'acides gras saturés à chaînes droites et moins d'acides gras insaturés (Satyanarayana et al., 2013). Les acides gras saturés forment un environnement hydrophobe, et les acides gras à longue chaîne ont un point de fusion plus élevé que les acides gras à chaîne courte. Globalement, ces deux paramètres augmentent la stabilité de la membrane cytoplasmique (Vavitsas et al., 2022).

### III. Intérêt des thermophiles en biotechnologie

La flore colonisant les environnements chauds est très particulière, notamment au niveau physiologique et métabolique. Ces nouvelles souches thermophiles sont fondamentales dans le domaine de la biotechnologie.

Les bactéries et archées qui résident dans les sources chaudes peuvent parfaitement proliférer à des températures supérieures parfois à 90°C et à des pH extrêmes. En effet, cette microflore a apporté une innovation majeure dans le domaine de la biotechnologie. Ainsi, *Thermus aquaticus*, une bactérie thermophile (Température optimale 70°C) et aérobie, qui fut isolée du parc national de Yellowstone, dans le Wyoming, à la fin des années 1960 (Borck et Freeze, 1969), a été la source de la célèbre ADN polymérase appelée *Thermus aquaticus* (Taq), devenue un élément incontournable de la biologie moléculaire. De plus, les enzymes thermostables telles que les polymérases et autre, provenant de microorganismes thermophiles, sont disponibles sur le marché. Ces enzymes sont utilisées dans diverses applications, notamment dans des procédés de fermentation en anaérobie pour le traitement de l'eau, la production de combustibles, ainsi que l'élimination du soufre dans l'industrie pétrolière (Giddings et Newman, 2015).

## 1. Thermoenzymes

### 1.1 Définition

Les enzymes thermostables sont des protéines de grandes tailles synthétisées par des micro-organismes thermophiles, qui se distinguent par leur capacité à catalyser des réactions biochimiques particulières (**Alain, 2003**). Ces enzymes sont considérées comme les meilleurs candidates pour les processus catalytiques opérant à des températures élevées car ils sont habitués à déjouer l'irréversible inactivation pouvant être causé par les hautes températures et ceci jusqu'à 125°C pour certaines (**Kumar et al., 2019; Thapa et al., 2019**). Les thermoenzymes sont également dotées de propriétés telles que la tolérance aux solvants, la résistance aux dénaturants, la sélectivité du substrat et des vitesses de réaction plus élevées, ainsi, ce qui les rendent potentiellement plus adaptées aux applications par rapport aux mésoenzymes (**Sharma et al., 2019**).

Les enzymes thermostables les plus utilisées en industrie font partie de la classe des hydrolases principalement représentée par les protéases, les amylases les lipases, les cellulases et les xylanases. La majorité des enzymes hydrolytiques (environ 65%) sont utilisées en industries des détergents, des textiles, de l'amidon, des pâtes et papiers, du cuir et des produits de soin corporel. Environ 25% des enzymes sont utilisées dans la transformation des produits alimentaires et les 10% restants sont préparées en tant que complémentaire dans l'alimentation animale (**Dubnath et al., 2019 ; Thapa et al., 2019**).

#### a) Amylases

Les amylases sont des enzymes qui fragmentent l'amidon en clivant les liaisons  $\alpha$ -1,4-O-glycosidiques internes pour donner divers produits, dont le glucose et le maltose. En effet, elles catalysent des réactions hydrolytiques de l'amylose (amidon non ramifié), de l'amylopectine (amidon ramifié), du glycogène (amidon animal) et des polymères de glucoses apparentés (**Allala, 2020**). On distingue deux types d'amylases: les  $\alpha$ -amylases (EC 3.2.1.1) et les  $\beta$ -amylases (EC 3.2.1.2) (**Gupta et al., 2003**).

L' $\alpha$ -amylase est l'idéal représentant des enzymes hydrolytiques thermostables, elle constitue un modèle intéressant pour l'étude des bases structurales de la thermostabilité des protéines. *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearotherophilus*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus amyloliquefaciens* sont des bonnes productrices d' $\alpha$ -amylase thermostables et elles ont été largement utilisées pour la production commerciale de l'enzyme pour diverses applications (**Prakash et Jaiswal, 2010**). *Tepidimonas fonticaldi* HB23 est une bactérie thermophile productrice d'une enzyme thermostable de type  $\alpha$ -amylase, isolée de la source hydrothermale Hammam Righa (**Allala, 2020**).

Les amylases microbiennes thermostables offrent d'innombrables avantages, elles sont obtenues à de faibles coûts, temps de production réduit et processus de modification et d'optimisation simplifiés. L'amylase est largement utilisée dans les industries alimentaires, textiles, papetières, et pharmaceutique (**Al-Johani et al., 2016**) et dans diverses applications

environnementales comme la dégradation des déchets organiques, l'hydrolyse des matières premières, amélioration de la digestion des matières premières chimiques, et du bio-blanchiment de la pâte (Soy et al., 2019), dans la boulangerie, dans les fermentations, production d'alcools et de bières hypocaloriques, dans les détergents, dans la production de sirop de maïs et de chocolat, purification de jus de pomme et de poire, production de malt et élimination de la viscosité dans l'industrie du papier (Saeed et al., 2021).

### b) Cellulase

La cellulose est une ressource renouvelable à fort potentiel pour la bioconversion de bioproduits à valeur ajoutée. Elle peut être dégradée par les cellulases produites par les bactéries cellulolytiques (Rigoldi et al., 2018). Les cellulases sont classées en trois classes d'enzymes: les exoglucanases (EC 3.2.1.91), les endoglucanases (EC 3.2.1.4) et la  $\beta$ -glycosidase (EC 3.2.1.21) (Sahoo et al., 2020). L'hydrolyse enzymatique complète de ce polysaccharide nécessite l'action synergique des 3 enzymes pour convertir la cellulose en monomères de glucose (Potprommanee et al., 2017). En effet, les cellulases sont des enzymes hydrolysant la liaison  $\beta$ -1,4 glycosidique de la cellulose en glucose, qui quant à lui convient à la consommation humaine (Sahoo et al., 2020). Ces sucres peuvent à leur tour être fermentés pour générer du bioéthanol et des produits biosourcés (Shabih et al., 2018). Les cellulases trouvent également une application dans l'industrie textile, où elles sont utilisées pour le polissage des tissus et dans l'industrie des détergents à lessive (Rigoldi et al., 2018).

Plusieurs cellulases ont été purifiées et caractérisées à partir des bactéries thermophile: *Thermotoga maritima* (Bronnenmeier et al., 1995), *Caldocellum saccharolyticum* (Te'o et al., 1995), *Thermotoga neapolitana* (Bok et al., 1998), *Anaerocellum thermophilum* (Zverlov et al., 1998)

Ces dernières années, plusieurs d'autres nouvelles cellulases thermostables (*Bacillus*, *Streptomyces*...etc.) ont été purifiées et caractérisées (Azadian et al., 2016; Budihal et al., 2016; Zarafeta et al., 2016).

### c) Lipases

Les lipases sont des classes d'enzymes les plus couramment utilisées en biocatalyses. En effet ces macromolécules (EC 3.1.1.3) connues sous le nom de triacylglycérol acyl-hydrolase, ciblent les liaisons ester carboxyliques, elles font partie de la famille des hydrolases et de la classe des sérines hydrolases (Chandra et al., 2020). Elles sont dotées d'un large potentiel spécifique de biotransformation (Rabbani et al., 2014).

En plus de l'activité hydrolytique, elles sont capables d'inverser la réaction dans des conditions anhydres pour effectuer une activité d'estérification, d'aminolyse et d'alcoolyse qui est une réaction importante dans de nombreuses industries (Chandra et al., 2020). Elles hydrolysent les triacylglycérols insolubles en acides gras libres, mono et diacylglycérols et glycérol (Bhardwaj et al., 2017).

Les lipases microbiennes sont les biocatalyseurs les plus utilisés dans les applications environnementales et industrielles (**Verma et al., 2021**). Les produits des réactions catalysées par les lipases sont de meilleure qualité et la consommation d'énergie est inférieure à celle des méthodes conventionnelles (**Rabbani et al., 2014**). Avec des rendements élevés, et moins de sous-produits ou de produits secondaires indésirables (**Verma et al., 2021**).

Les lipases produites par des microorganismes thermophiles restent actives dans les solvants organiques ce qui améliore leur potentiel et leur flexibilité en tant que biocatalyseurs. Leur application principale est la synthèse de précurseurs de composés pharmaceutiques actifs et la conversion de graisses et d'huiles naturelles en produits de grande valeur tels que le cacao, le beurre et les acides gras oméga-3 enrichis en huile (**Bhardwaj et al., 2017**). Elles catalysent des réactions inconcevables avec les lipases mésophiles. Et elles sont actives à des températures, pH, salinité et pression extrême (**Verma et al., 2021**). Cependant, la majorité des lipases actuellement commercialisées sont d'origine fongique (**Li et al., 2016**).

### d) Chitinase

La chitine, élément structural principal de la plupart des mycètes et de quelques invertébrés, est un polysaccharide linéaire constitué de résidus de N-acétylglucosamine. La dégradation de ce polymère est catalysée par les chitinases qui sont largement répandues dans le règne animal, végétal et fongique. Elles se composent de chitine endo-hydrolases (Chitinases A: EC 3.2.1.14), des oligomères exo-hydrolases (Chitinases B: EC 3.2.1.52) et la N-acétyl-D-glycosaminidase (Chitobiase: EC 3.2.1.30) (**Antranikian et al., 2005; Antranikian, 2008**).

Les chitinases thermostables sont particulièrement utiles dans les applications industrielles qui nécessitent des conditions de traitement à haute température, comme la production de biocarburants à partir de biomasse végétale. Elles sont utilisées pour l'hydrolyse de la chitine et la bioconversion des déchets chitineux, pour des applications potentielles dans divers domaines de la biotechnologie, de la biomédecine, de l'agriculture et de la nutrition (**in Bouacem et al., 2018**).

### e) Protéase

Les protéases, également connues sous le nom d'enzymes protéolytiques, sont présentes chez tous les organismes vivants. Elles occupent une place privilégiée sur le plan physiologique et commercial (**Lalmanach, 2008**).

Les protéases, faisant partie de la catégorie des hydrolases, sont parmi les enzymes hydrolytiques les plus essentiels et les plus étudiées de manière approfondie. Elles sont classées selon plusieurs critères majeurs tout en se basant sur la longueur de la chaîne polypeptidique, leur mode d'action, la nature du résidu nucléophile de leur site actif, leur structure tridimensionnelle et leur origine évolutive (**Gupta et al., 2002**).

Les thermophiles disposant des protéases dont l'intérêt s'est accru ces dernières années en raison de leurs applications variées dans les industries agro-alimentaires, biomédicales, textiles, pharmaceutiques. *Bacillus* sp. est l'une des meilleures sources de protéase thermostable.

Les protéases thermoactives sont également utilisées dans certaines techniques de biologie moléculaire, tels que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et le séquençage de l'ADN (Vieille et Zeikus, 2001).

*Caldicoprobacter algeriensis* TH7C1<sup>T</sup> est une souche bactérienne isolée d'une source thermale en Algérie, produit une kératinase extracellulaire thermostable (KERCA) dont l'activité optimale a été obtenue à 50°C et à pH 7. En effet, les propriétés de l'enzyme KERCA font d'elle une alternative potentielle prometteuse et écologique aux produits chimiques conventionnels utilisés pour l'épilation des peaux de chèvre, de mouton et de bovin dans l'industrie du cuir (in Bouacem et al., 2016).

### f) Xylanases

Les xylanases ont un rôle important dans la décomposition enzymatique de l'hémicellulose, dont le xylan est le principal constituant, pour donner des sucres monomères, il s'agit d'enzymes hydrolytiques (O-glycosidique hydrolases) qui clivent au niveau de la liaison  $\beta$ -1, 4-xylosidique du xylane, un constituant important de la paroi cellulaire végétale (Dubnath et al., 2019). Ces enzymes ont suscité un intérêt croissant pour la production de sucre à partir des biomasses ligno cellulosique, leurs utilisations s'étendent maintenant à de nombreuses industries de transformation, telle que la pâte à papier, l'alimentation et le textile (Rigoldi et al., 2018; Bouacem et al., 2014). Des bactéries thermophiles appartenant au genre *Thermoanaerobacterium*, *Thermotoga*, *Alicyclobacillus*, *Anoxybacillus* ainsi que *Cellulomonas* sont connus pour leur production de xylanases.

Les travaux de Bouanane-Darenfed et al. (2016) ont abouti à la caractérisation de la xylanase XYN35 produite par *Caldicoprobacter algeriensis* TH7C1<sup>T</sup> ayant une température et pH optimaux de 70°C et 11 respectivement. Cette xylanase thermo-alcaline-tolérante est une candidate prometteuse pour une éventuelle utilisation industrielle notamment dans le processus de blanchiment de la pâte à papier (Bouacem et al., 2014).

Récemment, le gène *xynBCA* a été identifié dans le génome de la bactérie *Caldicoprobacter algeriensis* TH7C1<sup>T</sup>, il est responsable de la production d'une xylanase. Cette enzyme a été clonée et produite de manière artificielle dans la bactérie *Escherichia coli*, ainsi elle a été produite et purifiée et elle s'est avérée être thermostable, et représente une activité optimale à une température de 80°C et à un pH 6,5. Elle pourrait être utilisée dans le bio-blanchiment de la pâte kraft (Mhiri et al., 2020).

### 2. Production de biopolymères

Les polymères bactériens offrent plusieurs avantages dans le domaine de l'exploitation biotechnologique, notamment leur indépendance vis à vis d'aléas climatiques et écologiques pouvant affecter leur qualité, le coût et l'approvisionnement de leurs homologues extraits d'algues ou de plantes. Depuis la découverte des sources hydrothermales, plus de 30 exopolysaccharides aux propriétés intéressantes ont été identifiés. Cependant, les découvertes les plus remarquables concernent la détermination de structures polysaccharidiques complexes. Un dérivé de bas poids moléculaire (24 000 g/mol) et fortement sulfaté (40 %) a pu ainsi être obtenu à partir d'un exopolysaccharide sécrété en conditions de laboratoire par la bactérie *Alteromonas infernus* isolée du fluide d'un site hydrothermal du bassin de Guaymas. L'étude de son mécanisme d'action par l'équipe du professeur Fischer à l'Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP) à Paris, a montré que tout comme l'héparine, ce dérivé inhibe la génération de thrombine (**Guézennec, 2004**).

Des recherches ont révélé que seuls quelques microorganismes prélevés à partir des sédiments hydrothermaux du bassin de Guayamas en Basse-Californie sont capables de synthétiser en conditions de laboratoires des "polyhydroxyalcanoates" (PHAs) (**Guézennec et al., 1998; Simon-Colin et al., 2008**). Ces PHAs sont exploités dans la production des plastiques biodégradables (**Laycock et al., 2013**).

### 3. Avantages des thermophiles

Les microorganismes thermophiles sont extrêmement intéressants d'un point de vue biotechnologique, en particulier en ce qui concerne leur système enzymatique. Plusieurs avantages sont apportés par l'utilisation de ces enzymes par rapport aux enzymes classiques.

#### 3.1 Réduction de la viscosité

La viscosité et la tension superficielle de l'eau sont diminuées par l'augmentation de la température, ce qui a des effets avantageux sur la fermentation microbienne.

#### 3.2 Amélioration de la stérilité

Les contaminations des milieux de culture par les différents phages ou bactéries parasites sont moins fréquemment observées dans les fermentations menées à hautes températures (**Yang et al., 2012**).

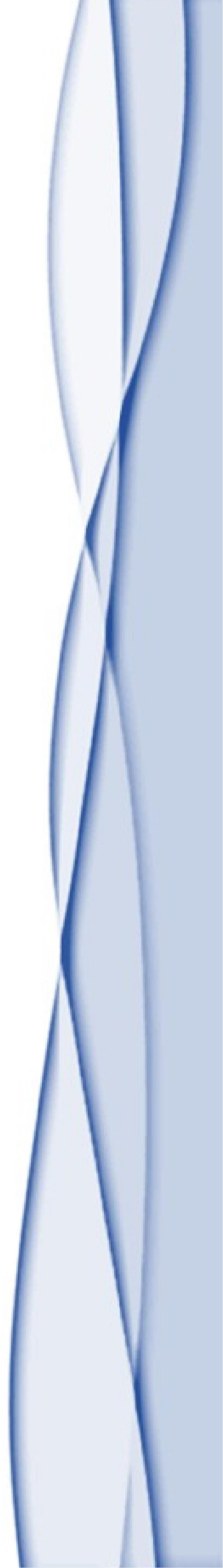
#### 3.3 Diminution des coûts de refroidissement

Comme les fermentations thermophiles n'ont pas besoin d'être intensément refroidies, cela constitue une économie d'énergie et diminue le coût du procédé.

### 3.4 Facilité de récupération des produits de catalyses

À haute température, la récupération des produits de catalyse ou de fermentation est plus aisée en raison de la diminution de la viscosité du milieu de culture et de l'augmentation de la solubilité des composés non gazeux. A ces températures, il devient possible, en appliquant un vide modéré ou en ventilant avec le dioxyde de carbone, d'améliorer la distillation des produits volatiles qui pourrait inhiber la croissance des cellules, ou qui sont intéressants en eux même, comme dans le cas de la production d'éthanol (**Krahe et al., 1996; Kumar, 2001**).

# *Matériel et méthodes*

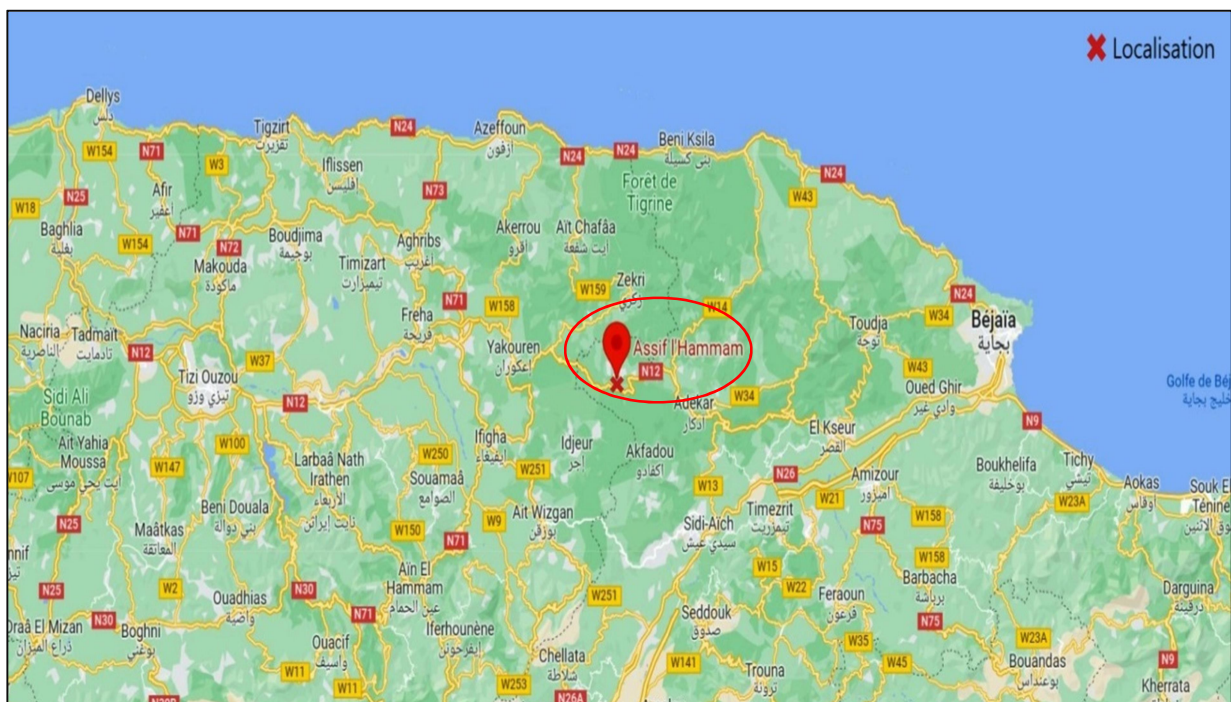


## Cadre de l'étude

Ce travail a été effectué au niveau du Laboratoire de Sécurité Alimentaire et Environnement de la Police Scientifique (LCPS de Ben Aknoun) et le laboratoire pédagogique de microbiologie à la Faculté des Science Biologique et des Sciences Agronomiques durant une période de trois mois s'étalant du mois d'avril jusqu'à la fin du mois de Juin 2023. Il a pour objectif l'étude des propriétés physico-chimiques, microbiologique et l'évaluation de la qualité sanitaire de l'eau thermale d'Assif El Hammam ainsi que le criblage enzymatique des souches isolée à partir de cette source.

## I. Site d'étude

La source thermale Assif El Hammam (coordonnées GPS: 36° 43' 51" Nord, 4° 34' 56" Est) est une région rurale au cœur de la Kabylie comme le montre la **figure 6**. Cette source est située dans la localité d'Assif El Hammam, à 60 km de (Bejaia) et à 75 km de (Tizi Ouzou) au Nord de l'Algérie. Administrativement, la région est une partie de la commune de la d'aira d'Adekar, wilaya de (Bejaïa). Culturellement, c'est une région beaucoup plus Tizi Ouzienne. Assif El Hammam fait partie des plus importantes stations thermales de la Kabylie. Cette source thermale est connue pour ses caractéristiques thérapeutiques faisant d'elle une destination incontournable pour un nombre exceptionnel de visiteurs chaque année.



**Figure 6: Localisation géographique de la source thermale d'Assif El Hammam**  
[https://fr.wikipedia.org/wiki/Assif\\_El\\_Hammam#/maplink/1](https://fr.wikipedia.org/wiki/Assif_El_Hammam#/maplink/1).

## II. Matériel

### 1. Matériel biologique

Les 14 souches bactériennes utilisées ont été isolées et purifiées à partir des échantillons d'eau et du sol de la station thermal d'Assif El Hammam Adekar (Bejaia).

### 2. Matériel non biologique

Le matériel et l'appareillage utilisés dans cette étude sont cités dans le **tableau A** en annexe 1.

## I. Méthodes

### 1. Échantillonnage

Les prélèvements des différents échantillons d'eau et du sol ont été effectués de façon aseptique dans des flacons en verre stérile de 2 L. Les sites de prélèvements sont décrits dans le **tableau IV** ci-dessous.

**Tableau IV: Sites de prélèvement de l'eau et du sol.**

|                 | Échantillons | Site                                     | Volume |
|-----------------|--------------|--|--------|
| Eau             | E1           | Tuyau du bassin intérieur                | 2 L    |
|                 | E2           | Tuyau du bassin extérieur                | 2 L    |
| Sol<br>(Argile) | S1           | A proximité du tuyau du bassin intérieur | 250 mL |
|                 | S2           | Loin du tuyau du bassin extérieur        | 250 mL |

### 2. Analyses physico-chimiques des eaux

La nature et la composition de l'eau conditionnent le développement et la répartition de la flore microbienne aquatique (**Rodier, 2005**), elle a également un rôle important dans l'orientation thérapeutique c'est pourquoi on a jugé utile de déterminer les différents paramètres physico-chimiques.

#### 2.1. Mesure du potentiel d'hydrogène

Le pH est une mesure logarithmique et un paramètre qui caractérise le degré d'acidité ou la basicité d'un milieu, il mesure plus précisément la concentration en ions  $H^+$  (protons) présents dans ce milieu, il est mesuré sur une échelle allant de 0 à 14 en utilisant un pH mètre (**Annexe 2**).

On peut noter qu'un pH de 7 est considéré comme neutre, pH inférieur à 7 indique une acidité croissante, tandis qu'un pH supérieur à 7 indique une basicité croissante.

### 2.2 Mesure de la conductivité électrique

La conductivité est une caractéristique physique qui quantifie la capacité de l'eau et permet le passage du courant électrique (Wetzel, 2001). Cette capacité est étroitement liée à la concentration d'ions présents dans l'eau. Pour mesurer la conductivité, on utilise un conductimètre en laboratoire de chimie. Ce dispositif comporte une électrode qui est émergée dans l'échantillon et la conductivité de cet échantillon est lue directement sur l'appareil en ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). La lecture est faite à une température ambiante de  $28,8^\circ\text{C}$  (Annexe 2).

### 2.3 Mesure de la turbidité

La turbidité est une mesure de la quantité de matière en suspension telles que des sédiments, des particules organiques ou inorganiques dans un liquide qui affecte la transmission de la lumière à travers le milieu. Elle est souvent utilisée pour évaluer la qualité de l'eau. Elle est mesurée en unités de néphélométrie (NTU) ou en unité de formazine (FNU). Une forte turbidité peut indiquer la présence de contaminant dans l'eau. Les normes de la turbidité sont établies pour assurer la sécurité de l'eau potable et pour protéger les écosystèmes aquatiques en générale. Une turbidité inférieure à 1 NTU est considérée comme acceptable pour l'eau potable.

### 2.4. Mesure de la salinité

Le taux de la salinité (TDS) est directement donné par ce même appareil en  $\text{mg}/\text{L}$ .

### 2.5 Détermination des résidus secs

La méthode consiste à mesurer la masse des matières solides qui restent après évaporation de l'eau dans l'échantillon. Cette masse représente la quantité de matière dissoutes et en suspension dans l'eau.

Prélever 100 mL de l'échantillon d'eau dans une capsule qui doit être propre avant l'utilisation, porter la capsule à l'étuve à une température de  $105^\circ\text{C}$ , laisser refroidir pendant un quart d'heure au dessiccateur puis peser.

Les résultats sont donnés en  $\text{mg}/\text{L}$  par la formule suivante:

$$\text{RS (mg/L)} = (\text{PP-PV}) \times 10 \times 100$$

PP: est le poids plein de la capsule;

PV: est le poids vide de la capsule

### 2.6 Détermination du taux d'oxygène dissous par électrochimie

Cette méthode implique l'utilisation d'une sonde d'oxygène qui est immergée dans l'eau à analyser. La sonde contient une électrode de référence et une électrode de mesure de l'oxygène dissous.

Lorsque la sonde est immergée dans l'eau, l'oxygène dissous dans l'eau diffuse à travers une membrane spéciale et entrera en contact avec l'électrode de mesure de l'oxygène dissous et une réaction électrochimique se produit générant un courant électrique proportionnel à la concentration d'oxygène dissous dans l'eau.

### 2.7 Mesure de la résistivité

La résistivité est l'inverse de la conductivité électrique, renseigne sur la minéralisation de l'eau (la concentration en électrolyte dissous). Cette résistivité dépend de la composition chimique de l'eau, de sa température et de sa pression. En général, elle contient des minéraux dissous, tels que le sodium, le potassium, le magnésium et le calcium qui peuvent augmenter sa conductivité électrique. Pour mesurer la résistivité en utilise un appareil multi usage qui contient une sonde de mesure, elle est généralement exprimée en ohm-mètre.

### 2.8 Dosage des anions et cations

#### 2.8.1 Dosage du calcium par la méthode titrimétrique

La détermination du contenu des ions calcium dans une solution peut être réalisée par titrage molaire avec une solution d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) qui est un ligand chélateur qui forme des complexes stables avec des ions métalliques (**D'après le kit**).

Le pH de la solution d'EDTA est généralement ajusté à pH 10 pour assurer une réaction optimale entre l'EDTA et les ions métalliques.

#### 2.8.2 Dosage des chlorures par la méthode de Mohr

Le principe repose sur le titrage des chlorures présents dans un milieu composé de deux phase, eau-chloroforme, de la teneur en matière active anionique par titrage à l'aide d'une solution titrée de matière active cationique (chlorure de benzéthonium) en présence d'un indicateur qui est un mélange colorant cationique. D'après les instructions du fournisseur

#### 2.8.3 Dosage des sulfates( $\text{SO}_4^{-2}$ ), nitrites( $\text{NO}^{2-}$ ), nitrates ( $\text{NO}_3^{-}$ ), ammoniums ( $\text{NH}_4^{+}$ ) et phosphates ( $\text{PO}_4^{-3}$ ).

L'autoanalyseur SKALAR permet une analyse automatisée de la concentration de divers composés chimique tels que les ions sulfates, nitrites, nitrates, phosphates, ammoniums dans les échantillons. Il utilise une méthode en flux continu et un colorimètre pour mesurer la concentration des éléments cibles et une interface informatique pour convertir les données de mesure en concentrations et produire des graphiques représentatifs.

### a) Nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), Nitrites ( $\text{NO}_2^-$ )

Dans un récipient propre, la languette test a été immergée dans l'échantillon à analyser pendant 1 seconde puis l'excès a été éliminé après 60 secondes, le résultat obtenu a été comparé avec l'échelle de couleur (**Selon les instructions du fournisseur**).

### b) Cyanure

Le récipient gradué a été rincé avec l'échantillon à analyser puis remplis jusqu'à la graduation de 5 mL. Ensuite, le pH de l'échantillon a été déterminé. Par la suite, une cuillère de cyanure 1 (mélange tampon) et 5 gouttes de cyanure-2 ont été ajoutées à la solution on l'a secouant légèrement. Enfin, la languette a été immergée immédiatement pendant 45 secondes dans la solution et elle a été comparée avec l'échelle de couleur (**Selon les instructions du fournisseur**).

### c) Ammonium

Le récipient gradué a été rincé avec l'échantillon à analyser puis remplis jusqu'à la graduation de 5 mL. Ensuite, 10 gouttes d'ammonium ont été ajoutées à la solution on l'a secouant légèrement. Enfin, la languette a été immergée immédiatement pendant 5 secondes dans la solution et elle a été comparée avec l'échelle de couleur (**Selon les instructions du fournisseur**).

### d) Phosphate

Le récipient gradué a été rincé avec l'échantillon d'eau, remplis jusqu'à la graduation de 5 mL. Ensuite, 5 gouttes de phosphates-1 ont été ajoutées et elles ont été légèrement secouées. Enfin, la languette a été immergée immédiatement pendant 15 secondes dans la solution et après 60 secondes, elle a été comparée avec l'échelle de couleur (**Selon les instructions du fournisseur**).

## 2.8.4 Recherche des métaux lourds par spectrophotométrie d'absorption atomique

L'évaluation de la présence des ions et les métaux lourds dans les quatre échantillons étudiés a été obtenue en ajoutant chaque fois à notre échantillon des réactifs spécifiques de chaque métal lourd recherché. Les réactifs utilisés sont cités dans le **tableau B** en **annexe 3**.

## 2.4.5. Dosage de l'arsenic par colorimétrie

L'arsenic est un élément chimique qui peut former des composés non organiques, il contient des composés qui peuvent être réduits en présence d'acide par l'hydrogène. L'hydrure d'arsenic ainsi formé peut réagir avec le diéthylthiocarbonate d'argent pour former un composé rouge et cette réaction peut être utilisée pour doser la quantité d'arsenic présente dans un échantillon car la couleur de la solution change de jaune à rouge en fonction de la concentration en arsenic.

La cuvette de réaction a été remplie avec l'échantillon, à l'aide d'une seringue de 10mL. Ensuite une cuillère d'arsenic 1 et une autre d'arsenic 2 ont été ajoutées puis agitées et

introduire 2 cm la surface de la bandelette de test dans la cuvette de réaction puis la fixer avec le couvercle ensuite agiter 3 fois l'échantillon pendant la période de réaction de 30 min.

### 3.3. Analyse bactériologique des échantillons d'eau

Dans l'objectif de connaître et d'évaluer la charge de la flore bactérienne présente dans les échantillons, la filtration est une étape importante. En effet cette dernière va permettre de déterminer la qualité de l'eau et le potentiel de contamination bactérienne.

#### 1.1.1. Méthode de filtration membranaire

##### Définition :

C'est un procédé physique disposé généralement après la décantation ou la flottation (notamment dans le cas des eaux de surface). Ce procédé peut être toute fois situé directement après une coagulation (cas des eaux souterraines karstiques) ou après une peroxydation (cas des eaux souterraines contenant du fer, du manganèse ou de l'arsenic).

Remplir les entonnoirs avec un volume à filtrer maximal de 250 mL, ouvrir les robinets pour des postes occupés (les autres doivent rester fermés pour pouvoir faire le vide), démarrer la pompe et une fois la filtration est effectuée, procéder à un rinçage des parois des entonnoirs avec de l'eau stérile, arrêter la pompe, casser le vide en débouchant la fiole pour chacun des postes enfin retirer la pince bloquante et poser l'entonnoir à plat sur un papier absorbant, prélever la membrane à l'aide d'une pince stérile et la déposer sur gélose (sans changer son orientation) (CEAEAQ, 2016).

#### 1.1.2. Recherche et dénombrement des germes

Différentes méthodes de recherche et de dénombrement des germes peuvent être utilisées en fonction du besoin et des normes réglementaires en vigueur. Les germes recherchés et les milieux utilisés sont cités dans le **tableau V**.

**Tableau V: Germes recherchés dans l'eau thermales et l'argile**

| Germes recherchés                     | Eau thermale et argile | Milieu utilisés (enrichissement et isolement)        |
|---------------------------------------|------------------------|--|
| <b>Flore mésophile aérobie totale</b> | Eau thermale et argile | Gélose Plate Count Agar                              |
| <b>Coliformes totaux</b>              |                        | Gélose lactosée                                      |
| <b>Coliformes fécaux</b>              |                        | Tergitole  |
| <b>Entérocoque fécaux</b>             |                        | Gélose Slanetz                                       |
| <i>Staphylococcus aureus</i>          |                        | Gélose Chapman                                       |
| <i>Clostridium sulfito-réducteur</i>  |                        | Gélose Viande foie + alun de fer + sulfite de sodium |
| <i>Pseudomonas</i>                    |                        | Gélose cétrimide                                     |
| <i>Bacillus cereus</i>                |                        | Gélose Mossel  |
| <b>Bactérie anaérobies</b>            |                        | Viande foie + Vaseline                               |
| <b>Flore thermophile aérobie</b>      |                        | Eau thermale   |

Le dénombrement est effectué sur les boites contenant un nombre de colonies compris entre 30 et 300 selon la loi de Kass:  $N=Nm \times 1/D \times 1/V$

**N:** Nombre de germe par mL; **Nm:** Nombre de colonies; **D:** Dilution; **V:** Volumeensemencé.

La filtration est effectuée pour la recherche de la flore microbienne saprophyte, pathogène et de contamination fécale. L'importance de la recherche de ces microorganismes réside dans leur pathogénicité au niveau cutané et des muqueuses. Les différents germes recherchés ainsi que les conditions opératoires sont regroupés dans le **tableau VI**.

**Tableau VI: Techniques utilisées pour la recherche des germes.**

| Germes recherchés  | Technique  | Lecture  |
|--|--|--|
| <b>Recherche et dénombrement de la flore mésophile totale</b>    | Après filtration, déposer le filtre sur la boîte contenant le milieu TGEA (gélose à la peptone de caséine, au glucose et à l'extrait de viande). Incuber à 37° pendant 48 h.   | Après incubation, les colonies de la flore mésophile totale apparaissent sur le filtre sous formes lenticulaires de couleur blanches à jaunâtres et bien distinctes.   |
| <b>Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux</b> | Après filtration, déposer le filtre sur la boîte contenant le milieu tergitol (gélose lactosée au TTC et tergitol). Incuber à 37°C pendant 24 voir 48h pour les coliformes totaux et à 44°C pendant 24h pour les coliformes fécaux.          | Les tubes positifs vont virer au jaune plus un dégagement du gaz dans la cloche de Durham, le volume du gaz doit être supérieur au 1/10 du volume total de la cloche. Chaque tube positif sera repiqué sur le milieu Schubert et incubé à 44 °C pour la mise en évidence d' <i>E. coli</i> , coliforme thermo tolérants producteur d'indoles à 44 °C .Les tubes positifs déterminent le chiffre caractéristique qu'on va lire dans les tables Mac Grady et se traduira par la suite en UFC/mL. |
| <b>Recherche des <i>Clostridium</i> sulfito réducteur</b>        | L'eau est chauffée au préalable à 80°C pendant 10 min ensuite introduire 5 mL de cette eau au 10 mL de milieu VF additionné au préalable d'Alène de fer et de sulfite de sodium, recouvrir les tubes de vaseline. Incuber à 37° pendant 24h. | Après incubation, les colonies caractéristiques apparaissent noires.   |

| Germes recherches  | Technique  | Lecture   |
|--|--|---|
| <b>Recherche et dénombrement des <i>Pseudomonas</i></b>          | Après filtration, déposer le filtre sur la boîte contenant le milieu au cétrimide. L'incubation se fait à 37°C pendant 48h.  | Ce milieu permet la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. stutzeri</i> et <i>P. maltophilia</i><br><br>La différenciation des espèces de <i>Pseudomonas</i> se fait par la mise en évidence de leur pigment sur milieu King A et King B. |
| <b>Recherche et dénombrement de la flore thermophile aérobie</b> | 1-Ensemencement en profondeur pour l'échantillon d'eau: Verser deux gouttes d'eau dans une boîte de pétri stérile puis les inonder avec la gélose PCA, homogénéiser enfin incubé à différentes températures (37, 44 et 55°C).<br><br>2-Ensemencement en surface pour l'échantillon du sol : Verser la gélose PCA dans des boîtes de pétri stérile laissé refroidir puis verser deux gouttes de la suspension bactérienne réaliser et la disperser à l'aide d'un râteau sur toute la surface. | Les colonies apparaissent sous différentes formes et couleurs.  |
| <b>Recherche et dénombrement des entérocoques fécaux</b>         | Après filtration, déposer le filtre sur la boîte contenant le milieu Slanetz et Bartley, puis incubé à 37° pendant 24h le filtre est transféré sur la gélose contenant la bile et l'esculine (B.E.A).  | Les entérocoques apparaissent sous forme de petites colonies pigmentées, lisses, légèrement bombées à contour réguliers.  |

## 2. Purification et caractérisation des souches isolées

Une fois les colonies obtenues sont purifiées, une étude morphologique, biochimique et physiologique a été effectuée sur toutes les souches.

### 2.1 Étude morphologique

#### 3.1.1 Observation macroscopique

L'examen macroscopique des colonies sur boîtes de Petri permet de décrire leur forme, leur taille, leur couleur, leur opacité, leur aspect de surface ainsi que leur contour.

#### 3.1.2 Observation microscopique

**Observation à l'état frais:** Cette observation permet la détermination de la forme des cellules, de leur mode d'arrangement et leur mobilité au grossissement ( $\times 40$ ).

**Observation à l'état fixé:** La coloration de Gram est une technique de coloration différentielle ou double coloration utilisée pour classer les bactéries en deux grands groupes (Gram positif et Gram négatif), selon leur affinité pour les colorants liés à la structure générale de leur paroi. La méthode utilisée est citée en **Annexe 4**.

### 2.2 Étude des caractères biochimiques

Pour la détermination des caractères biochimiques des différentes souches isolées, nous avons utilisé des tests classiques cités dans le **tableau D** en **annexe 6** et des galeries Api 20E.

La galerie API 20E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée spécifiques qui permettent de détecter différentes caractéristiques métaboliques des bactéries. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. L'interprétation se fait selon un tableau de lecture, **tableau C** en **Annexe 5**.

### 3.4 Études des caractéristiques physiologiques

Pour étudier l'effet des températures, de la concentration en NaCl et du pH sur la croissance, il est nécessaire de faire varier un des trois paramètres et maintenir les deux autres constants.

### 3.4.1 Influence du pH

L'influence du pH du milieu sur la croissance des souches bactériennes est déterminée en l'ajustant à différentes valeurs, à savoir: 5, 7, 9 et 11. Puis inoculer et incuber les échantillons à une température de 37°C.

### 3.4.2 Influence de la température

La température joue un rôle crucial dans la croissance optimale des microorganismes. Afin d'étudier l'effet de la température sur la croissance des souches bactériennes, nous avons incubé ces derniers à des températures variées de: 44°C pendant 48 h.

### 3.4.3 Influence de la salinité

Pour évaluer l'halotolérance, les cultures ont été étalées sur des milieux de culture solide classique auxquels on rajoute des concentrations différentes de NaCl : 1, 3, 7, 9 et 11 %. Après incubation à la température optimale pour chaque microorganisme, le développement a été vérifié.

## 4. Criblage d'activités enzymatiques

### a) Amylase

Pour mettre en évidence l'activité amylolytique, les souches bactériennes sont cultivées sur une gélose nutritive contenant 1% (v/m) d'amidon soluble. Les boîtes de cultures sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48h, après incubation le milieu gélosé est traité avec une solution de Lugol pendant 30 secondes suivis d'un rinçage à l'eau distillée.

La présence d'une zone claire autour des colonies indique une activité amylolytique tandis qu'un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour des cultures (**Benkahoul et al., 2017**).

### b) Chitinase

Pour rechercher l'activité chitinolytique, nous ajoutons 0,2 % (m/v) de chitine colloïdale à la gélose nutritive. Après incubation, la présence de l'enzyme se révèle par des zones d'hydrolyse claires entourant les colonies.

### c) Cellulase

Pour évaluer l'activité de la cellulase, on ajoute 0,5 (m/v) de carboxyméthyl cellulose à la gélose nutritive, après incubation, les boîtes de Petri sont submergées dans une solution de NaCl à 1M. Les boîtes sont ensuite laissées 5 à 10 min à température ambiante. La production de cellulases est détectée par l'apparition de zones claires autour des colonies.

### d) Lécithinases, lipoprotéinase et lipase

Le milieu à base de jaune d'œuf est un milieu complexe qui contient des phospholipides, plus particulièrement la phosphatidyle-coline (ou lécithine), des triglycérides et des lipoprotéines (*in Bouacem, 2021*).

Pour mettre en évidence la présence de l'enzyme lécithinases, lipoprotéinase et lipase. On utilise le milieu à 100 mL de GN additionné de 100 mL d'une émulsion de jaune d'œuf, comprenant du jaune d'œuf à (5 % v/v). La formation d'un précipité blanc sous forme d'opalescence autour ou sous la colonie révèle la présence de lécithinases (**Bennamar et al., 2020**).

- Un halo opaque blanc-jaunâtre à bordure nette autour de la colonie indique la présence d'une lécithinases.
- Un halo d'éclaircissement autour de la colonie indique la présence d'une Lipoprotéinase. La recherche de cette enzyme exige une lecture précoce.
- Une zone floue autour de la colonie indique la présence de lipase (*in Bouacem, 2021*).



*Résultats et  
Discussions*

### I. Résultats de l'analyse physico-chimique de l'eau

#### 1. Appréciation de la qualité organoleptique de l'eau

L'eau est de couleur transparente, elle n'a aucune odeur caractéristique et ne présente aucun signe de pollution apparent. Ce qui signifie généralement que l'eau est pure et exempts d'impuretés, de contaminants ou de substance indésirable et de particules en suspension, l'absence d'odeur indique qu'il ne contient pas de composée chimique ou biologique qui pourraient causer une odeur désagréable.

#### 2. Résultats des paramètres physico-chimiques

Les résultats des paramètres physico-chimiques sont représentés dans le **tableau VII**.

**Tableau VII: Résultats de l'analyse physico-chimique**

| Paramètres          | T (°C) | pH  | Turbidité (NTU) | Conductivité ( $\mu\text{s/cm}$ ) | Résidus secs (mg/L) | Salinité (mg/L) | O <sub>2</sub> dissout (mg/L) | Résistivité. Cm |
|---------------------|--------|-----|-----------------|-----------------------------------|---------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|
| Eau Assif El Hammam | 45     | 6,4 | 5,52            | 645                               | 300                 | 0,2             | 4,32                          | 1546            |

La température joue un rôle primordial dans l'étude des eaux, car elle influence grandement l'environnement aquatique en régissant la majorité des réactions physico-chimiques et biologiques qui s'y produisent (**Chapman et Kimstach, 1996**). La température de la source thermique étudiée est de 45°C, elle est considérée comme mésothermales.

Le pH joue un rôle essentiel dans la croissance des microorganismes. Lorsqu'il est inférieur à 5 ou supérieur à 8,5 cela a un impact direct sur leur développement (**Belghyti et al., 2010**). D'après les résultats indiqués dans le tableau ci-dessus, le pH de cette eau tend vers la neutralité (pH= 6,4).

D'après les résultats du **tableau VII**, on note une turbidité de 5,52 NTU, ce qui explique que cette eau est pauvre en matières en suspension, ainsi qu'une conductivité de 645  $\mu\text{S/cm}$  par rapport L'eau potable a généralement une conductivité d'environ 500  $\mu\text{S/cm}$

La teneur de l'eau en résidus secs, nous informe sur la minéralité. D'après les résultats ci-dessus la teneur en résidus sec dans l'échantillon est de 300 mg/L.

La salinité désigne la quantité de sels dissous dans un liquide, d'après l'analyse de notre eau on note une salinité de 0,2 mg/L. pour l'oxygène, plus la température est élevée, plus la concentration d'oxygène diminue ce qui explique le faible taux d'oxygène dissous dans l'eau de Assif El Hammam qui est de 4,32 mg/L.

## Résultats et discussions

D'après les résultats obtenus dans le tableau VII, on note une résistivité de 1546  $\Omega$ .Cm, par conséquent et en fonction du comportement électrique typique de l'eau, cette valeur peut être considérée comme faible.

### 3. Résultats de dosage des anions et des cations

L'échantillon d'eau de Assif El Hammam a fait l'objet d'une analyse ionique dans le but de déterminer la composition anionique et cationique. Le calcium est présent dans l'eau thermale en quantité qui est inférieure à 10 mg/L. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau VIII.

Tableau VIII: Résultats de la composition minérale des échantillons d'eau analysés

| Elements                            | Ca <sup>+2</sup> | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | N <sup>-</sup> | As    | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> |
|-------------------------------------|------------------|------------------------------|----------------|-------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Résultat de la composition minérale | 0                | < 10                         | trace          | Trace | < 10                         | < 1                          | < 200                         | 3                             |

D'après le tableau VIII, l'eau thermale de Assif El Hammam est riche en sulfates. Cependant, les autres ions dissous se présentent en faibles quantités ceci indiquerait l'absence de pollution.

### 4. Résultats de la recherche des métaux lourds par spectrophotométrie d'adsorption atomique

Les métaux lourds sont recherchés dans les eaux car ils représentent pour la plupart un indice de pollution et de toxicité (Rodier et al., 2005). Les résultats du dosage des métaux lourds par spectrométrie d'adsorption atomique sont représentés dans le tableau IX.

Tableau IX: Résultats du dosage des métaux lourds

| Métaux (mg/L) |    | Echantillons |       |       |       |       |       |
|---------------|----|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|               |    | Cu           | Zn    | Fe    | Cr    | Cd    | Pb    |
| Eau           | E1 | 0            | 0,008 | 1,025 | 0,001 | 0,003 | 0     |
|               | E2 | 0            | 0,015 | 0,194 | 0,007 | 0,004 | 0,001 |
| Sol           | S1 | 0,170        | 2,272 | 248,1 | 0,333 | 0,012 | 0,162 |
|               | S2 | 0,247        | 2,164 | 276,9 | 0,483 | 0,012 | 0,175 |

Il convient de noter qu'il est important de se référer aux valeurs limites et recommandées dans la réglementation locale et/ou internationale pour évaluer la conformité des concentrations de ces métaux lourds dans l'eau.

En s'appuyant sur les résultats obtenus (**Tableau IX**), et on les comparant avec celle de L'eau du robinet contient 0,003 mg de fer en moyenne. (directive européenne 98/83/CE du 03 Novembre 1998). On constate que l'eau thermale de la source Assif El Hammam est riche en fer avec un taux de (1,025 mg/L) pour E1 et (0,194mg/L) pour E2, tandis que les autres résultats révèlent des concentrations de métaux lourds relativement faibles, qui ne sont pas toxiques mais qui sont néanmoins suffisamment présentes pour induire une action thérapeutique.

### II. Résultats de l'analyse bactériologiques de l'eau

Chaque année, plus de 500.000 personnes fréquentent les établissements thermaux pour bénéficier des soins thérapeutiques, les traitements offerts sont fondés sur l'utilisation de l'eau minérale naturelle, considéré comme l'élément thérapeutique clé. Ces soins sont spécifiquement destinés au traitement des affections rhumatologiques et respiratoires, en particulier pour les patients défavorisés. Par conséquent, il est crucial que cette eau réponde à des critères rigoureux en matière de qualité microbiologique et sécurité adéquate (**Bouanane, 2012**).

#### 1. Résultats de l'analyse de la qualité sanitaire

Le **tableau X** regroupe les résultats des différents germes recherchés dans les eaux thermales de Assif El Hammam.

**Tableau X: Résultats de l'analyse microbiologique des eaux de Assif El Hammam**

| Genre recherches                      | Résultats |         |
|---------------------------------------|-----------|---------|
| Flore mésophile aérobie totale (FMAT) | E1        | 151 UFC |
|                                       | E2        | 130 UFC |
|                                       | S1        | 132 UFC |
|                                       | S2        | 249 UFC |
| Coliformes totaux (CT)                | Absence   |         |
| Coliformes fécaux (CF)                | Absence   |         |
| <i>Staphylococcus aureus</i>          | Absence   |         |
| <i>Clostridium sulfito réducteurs</i> | Absence   |         |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>         | Absence   |         |

Les résultats obtenus montrent la présence de la flore mésophile aérobie totale et l'absence de (Coliformes totaux et fécaux, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium sulfito-réducteurs* et *Pseudomonas aeruginosa*). L'eau d'Assif El Hammam présente une bonne qualité sanitaire. Cependant, il est crucial de préserver cette qualité tout au long de l'année et de surveiller l'évolution de la population microbienne grâce à des prélèvements répétés car cette eau pourrait être utilisée à des fins thérapeutiques.

### 2. Résultats de la caractérisation des souches

Une série d'études macroscopique, microscopique et biochimique a été réalisée pour l'ensemble des souches isolées en aérobiose.

#### 2.1. Etude morphologique

##### 2.1.1. Examen macroscopique

L'observation des caractères cultureux des colonies est le premier examen qui a été effectué après l'incubation des souches à 37°C sur la gélose PCA. Une culture chargée de colonies de taille, de forme et de consistance variables a été poussée, plusieurs purifications successives ont été effectuées et nous ont permis d'isoler 14 souches bactériennes d'aspects macroscopiques et microscopiques diversifiés, le **tableau XI** regroupe les caractéristiques macroscopiques des souches bactériennes isolées.

Après incubation, la plupart des souches présentent des colonies opaque, rondes, de petite taille, de surfaces lisses bombées et à bords régulier. Mais d'autres aspects macroscopiques ont aussi été observés chez d'autres souches, tels que la forme rhizoïdes et le contour irrégulier, ainsi qu'un diamètre grand ou moyen et une surface rigoureuse et translucide. La figure ci-après illustre quelques exemples d'aspects cultureux observés.

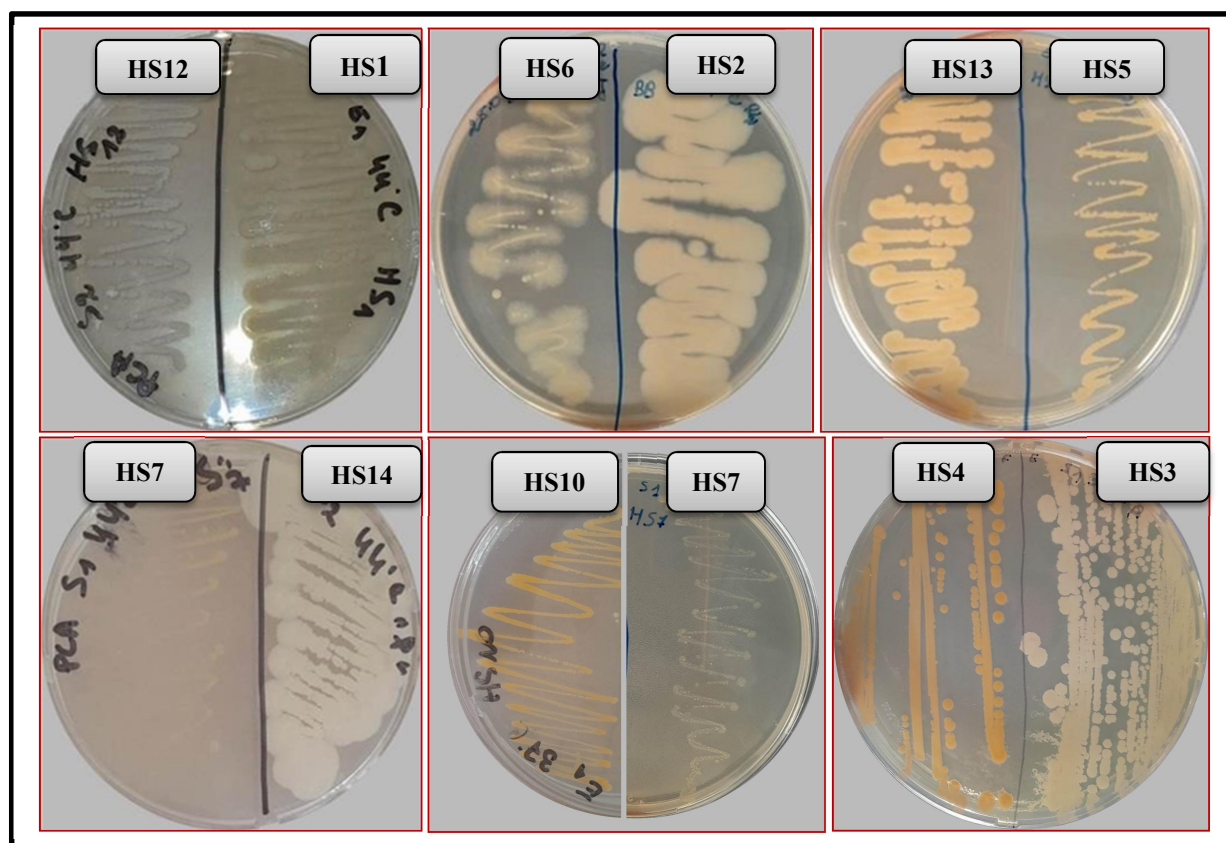


Figure 7: Aspect macroscopique de quelques souches isolées.

Tableau XI : Caractères macroscopiques des souches isolées.

| Aspect<br>Souches | Forme    | Taille  | Contour                   | Elévation | Surface    | Opacité     | Couleur      |
|-------------------|----------|---------|---------------------------|-----------|------------|-------------|--------------|
| HS1               | Ronde    | Moyenne | Régulier à bord dentelé   | Plate     | Lisse      | Opaque      | Beige        |
| HS2               | Rhizoïde | Grande  | Irrégulier à bord dentelé | Plate     | Rigoureuse | Opaque      | Beige        |
| HS3               | Ronde    | Moyenne | Régulier                  | Plate     | Lisse      | Opaque      | Blanche      |
| HS4               | Ronde    | Petite  | Régulier                  | Bombé     | Lisse      | Opaque      | Orange       |
| HS5               | Ronde    | Petite  | Régulier                  | Bombé     | Lisse      | Opaque      | Beige        |
| HS6               | Rhizoïde | Petite  | Irrégulier                | Plate     | Rigoureuse | Translucide | Blanche      |
| HS7               | Ronde    | Petite  | Régulier                  | Bombé     | Lisse      | opaque      | Orange       |
| HS8               | Ronde    | Moyenne | Régulier                  | Bombé     | Lisse      | Opaque      | Rouge        |
| HS9               | Ronde    | Petite  | Irrégulier à bord dentelé | Bombé     | Lisse      | Opaque      | Jaune        |
| HS10              | Ronde    | Petite  | Régulier                  | Plate     | Lisse      | Opaque      | Orange clair |
| HS11              | Ronde    | Grande  | Irrégulier                | Plate     | Rigoureuse | Opaque      | Blanche      |
| HS12              | Ronde    | Moyenne | Irrégulier                | Bombé     | Lisse      | Opaque      | Blanche      |
| HS13              | Ronde    | petite  | Régulier                  | Plate     | Lisse      | Translucide | Blanche      |
| HS14              | Ronde    | Petite  | Régulier                  | Plate     | Lisse      | Translucide | Blanche      |

### 2.1.2. Examen microscopique

Suite à une observation au microscope photonique, au grossissement ( $\times 40$ ) à l'état frais et fixé, nous avons constaté que toutes les cellules des souches isolées sont non sporulées à Gram positif excepté les 2 souches HS3 et HS8 qui sont des Gram négatif. HS1, HS10, HS4 sont cocci en chaînette mobile à Gram positif et 3 autres souches HS5, HS6, HS14, cocci isolés immobiles, les deux souches HS12 et HS13 sont des bâtonnets isolés et mobiles par contre HS7 et HS9 ces des cocci diplocoque non mobile, seul HS3 qui est cocci isolé mobile et HS8 qui est une cocci diplocoque mobile ainsi que HS11 qui ces révélée être coccobacille isolé mobile et en fin HS2 qui est bâtonnet. Les figures 8 et 9 illustrent l'aspect microscopique à l'état frais et fixé, respectivement, de quelques souches isolées.

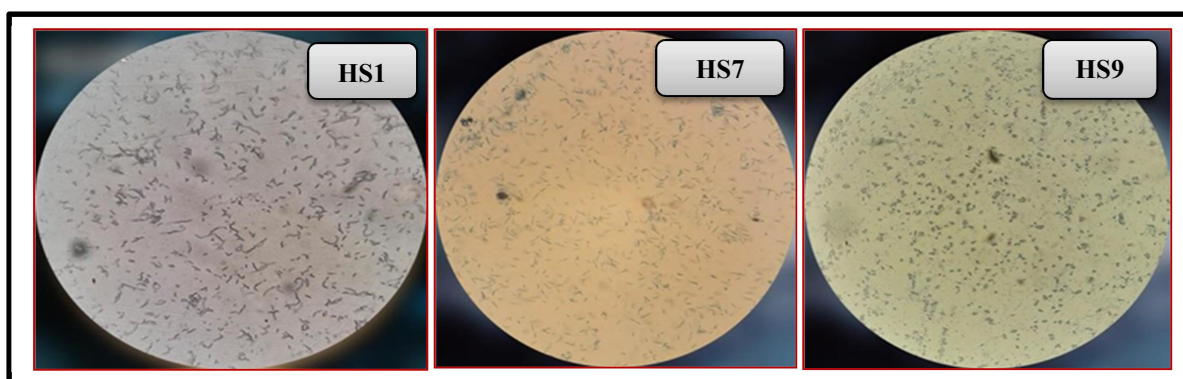


Figure 8: Observation à l'état frais des souches HS1, HS7, HS9

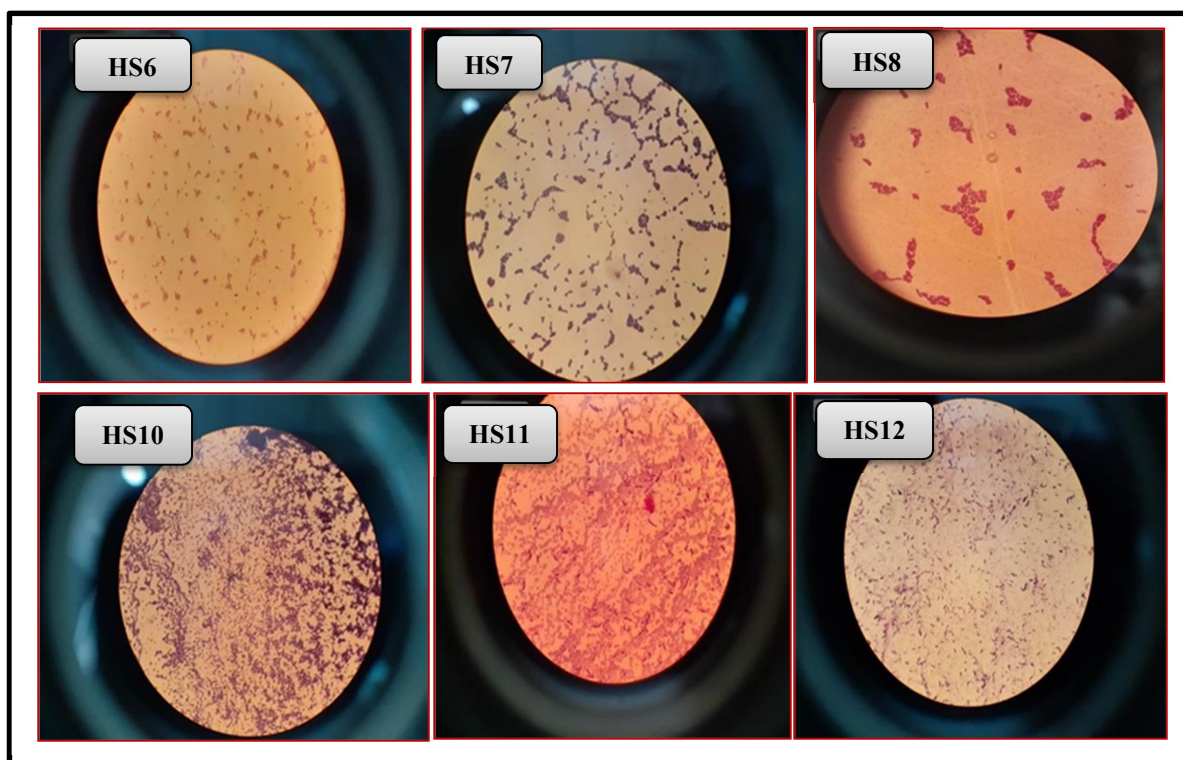


Figure 9: Observation de quelques souches après la coloration de Gram au GX100

Tableau XII: Résultats d'étude microscopique à l'état frais et à l'état fixé des souches isolées

| Souches \ Aspect | Etat frais    |                    |            |       | Etat fixé          |
|------------------|---------------|--------------------|------------|-------|--------------------|
|                  | Forme         | Mode d'arrangement | Mobilité   | Spore | Coloration de Gram |
| HS1              | Cocci         | En chainettes      | Mobiles    | Non   | Positif            |
| HS2              | Bâtonnets     | Diplocoques        | Mobiles    | Non   | Positif            |
| HS3              | Cocci         | Isolés             | Mobiles    | Non   | Négatif            |
| HS4              | Cocci         | En chainettes      | Mobiles    | Non   | Positif            |
| HS5              | Cocci         | Isolés             | Non mobile | Non   | Positif            |
| HS6              | Cocci         | Isolés             | Non mobile | Non   | Positif            |
| HS7              | Cocci         | Diplocoques        | Non mobile | Non   | Positif            |
| HS8              | Cocci         | Diplocoques        | Mobiles    | Non   | Négatif            |
| HS9              | Cocci         | Diplocoques        | Non mobile | Non   | Positif            |
| HS10             | Cocci         | En chainettes      | Mobiles    | Non   | Positif            |
| HS11             | Coccobacilles | Isolés             | Mobiles    | Non   | Positif            |
| HS12             | Bâtonnets     | Isolés             | Mobiles    | Non   | Positif            |
| HS13             | Bâtonnets     | Isolés             | Mobiles    | Non   | Positif            |
| HS14             | Cocci         | Isolés             | Non mobile | Non   | Positif            |

### 2.2. Caractérisation biochimique et métabolique

Toutes les souches isolées sont catalase positive à l'exception des souches: HS2, HS4, HS5, HS12, HS13, HS14. Les souches HS1, HS5, HS6, HS7, HS12, HS14 sont oxydase positive tandis que les autres souches sont oxydase négative. L'étude du type respiratoire sur la gélose viande-foie a permis de révéler que toutes les souches sont des aéro-anaérobie facultative à l'exception de deux souches HS5 et HS12 qui sont des aérobies strictes et la souche HS8 qui est micro-aérophile.

Les résultats de la caractérisation biochimique des souches en utilisant les galeries API 20E sont représentées dans le **tableau XVII** en **annexe 6**. D'après ces résultats, nous constatons que les souches, HS6, HS9, HS10, HS11 possèdent une  $\beta$ -galactosidase alors que les autres en sont dépourvues. Sur l'ensemble des souches, HS6 et HS10 sont arginine dihydrolase positive, HS6 est ornithine décarboxylase positive et HS6 et HS9 sont lysine décarboxylase positive. Les souches HS1, HS3, HS8 et HS14 possèdent un citrate perméase. Toutes les souches ne produisent pas de l'indole, il s'agit d'un caractère fréquent chez les bactéries thermophiles (**Nazina et al., 200; Mahilrajan et al., 2012; Selim et al., 2014**). Les souches HS1, HS2, HS4, HS5, HS7, HS9, HS11, HS12, HS13 et HS14 ne dégradent aucun sucre tandis que les autres souches produisent rarement de l'acide à partir des hydrates de carbone testés.

Il est important de signaler que les conditions de cultures choisies ont conditionné la biodiversité obtenue et nous pouvons supposer que dans d'autres conditions, cette biodiversité aurait été encore plus grande. Les espèces identifiées ne représentent qu'une petite partie de la diversité microbienne des différents écosystèmes de la planète. On estime que seulement 1 % des microorganismes est accessibles par des techniques culturales standard reposées sur l'isolement de souches (**Ammam et al., 1995**). L'essor de la biologie moléculaire peut permettre le développement des connaissances liées à cette diversité.

### 2.3. Caractérisation physiologique des souches bactériennes

Les souches bactériennes sont capables de se reproduire dans des milieux de culture artificiels solides ou liquide, à condition que les exigences nutritionnelles soient satisfaites. La croissance de ces souches requiert des conditions physicochimiques particulières approchant les conditions de leur écosystème naturel, à savoir: la température, le pH et la salinité. Les résultats de la caractérisation physiologique des différentes souches sont rassemblés dans le **tableau VII** ci-dessous.

#### a) Influence du pH sur la croissance

Toutes les souches se développent à un pH neutre (pH = 7). À un pH alcalin (pH = 9), toutes les souches sont capables de croître excepté HS8. Au pH11, la majorité des souches n'ont pas pu pousser à l'exception des trois souches HS5, HS6, HS7 ce qui les qualifie de

bactéries alcaliphiles. Au pH acide (pH = 5), seules les deux souches HS8 et HS12 n'ont pas pu se développer.

Notre eau est un réservoir de bactéries acidophiles ou alcaliphiles qui peuvent être utilisées dans des processus biotechnologie. Par ailleurs, le fait d'observer, une très bonne croissance chez la majorité des souches, à différent gamme de pH suggère que les bactéries ont développé des mécanismes d'adaptation à ces conditions.

### b) Influence de la température sur la croissance

Les résultats de l'influence de la température sur la croissance des souches isolées sont rassemblés dans le **tableau XIII**.

Toutes les souches isolées présentent une croissance optimale à 37°C. A 44°C toutes les souches ont été poussées excepté les deux souches HS4 et HS13. Les résultats détaillés sont présentés dans le **tableau XIII**.

### c) Influence de la salinité sur la croissance

Toutes les souches se développent à 1% de NaCl (**figure 10**). À 3, 7 et 9%, toutes les souches peuvent se croître à l'exception de la souche HS12 (**figure 11, 12, 13**). À 11% de NaCl, seules les souches HS7, HS9, HS10 et HS11 peuvent se développer. Nos résultats concordent avec ceux de **Ben salem** et ses collaborateurs (2012). D'après la littérature scientifique, il existe une grande diversité des microorganismes dans les sources hydrothermales terrestres.

Cette étude n'est qu'un tout premier essai d'isolement et de caractérisation de bactéries thermophiles, productrices d'enzymes capables de mener à bien des processus sous des conditions physico-chimiques extrêmes.

Tableau XIII: Résultats de l'influence de la température, la salinité et le pH sur la croissance des souches isolées

| Souches | Température °C |      | NaCl % |       |      |      |     | pH   |       |      |      |
|---------|----------------|------|--------|-------|------|------|-----|------|-------|------|------|
|         | 37°C           | 44°C | 1      | 3     | 7    | 9    | 11  | 5    | 7     | 9    | 11   |
| HS1     | +              | +    | ++++   | + +++ | ++   | +    | -   | ++++ | ++++  | +++  | -    |
| HS2     | +              | +    | ++++   | ++++  | ++   | +    | -   | +    | ++++  | ++++ | -    |
| HS3     | +              | +    | NE     | NE    | NE   | NE   | NE  | NE   | ++++  | NE   | NE   |
| HS4     | +              | -    | NE     | NE    | NE   | NE   | NE  | NE   | + +++ | NE   | NE   |
| HS5     | +              | +    | ++++   | +++   | ++   | ++   | -   | ++++ | ++++  | ++++ | ++++ |
| HS6     | +              | +    | ++++   | +++   | ++   | +    | -   | ++++ | ++++  | ++++ | ++++ |
| HS7     | +              | +    | ++++   | ++++  | +++  | ++   | +   | +    | ++++  | ++++ | ++++ |
| HS8     | +              | +    | +      | +     | +    | +    | -   | -    | ++++  | -    | -    |
| HS9     | +              | +    | ++++   | ++++  | ++++ | ++++ | +++ | +    | ++++  | +++  | -    |
| HS10    | +              | +    | ++++   | ++++  | +++  | ++++ | +++ | +++  | ++++  | +++  | -    |
| HS11    | +              | +    | ++++   | ++++  | ++   | +    | +   | ++++ | ++++  | ++++ | -    |
| HS12    | +              | +    | +++    | -     | -    | -    | -   | -    | ++++  | ++   | -    |
| HS13    | +              | -    | NE     | NE    | NE   | NE   | NE  | NE   | ++++  | NE   | NE   |
| HS14    | +              | +    | ++++   | ++++  | +++  | ++   | -   | ++++ | ++++  | +++  | -    |

**(+ + + +)** Très Bonne croissance.

**(NE)** Non effectué

**(+ + +)** Bonne croissance.

**(+)** Faible croissance.

**(-)** Pas de croissance.

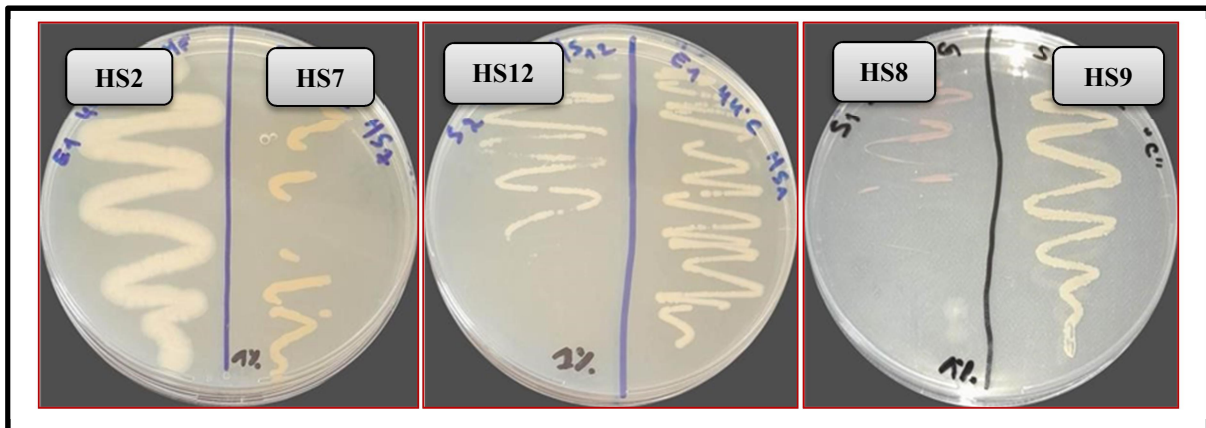


Figure 10: Résultats de la culture des souches à une concentration de 1% de NaCl

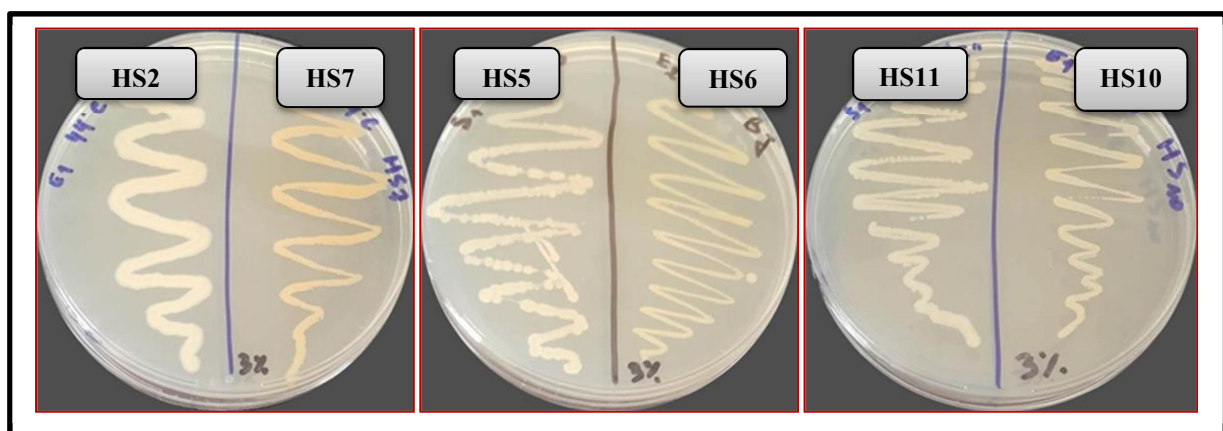


Figure 11: Résultats de la culture des souches à une concentration de 3% de NaCl

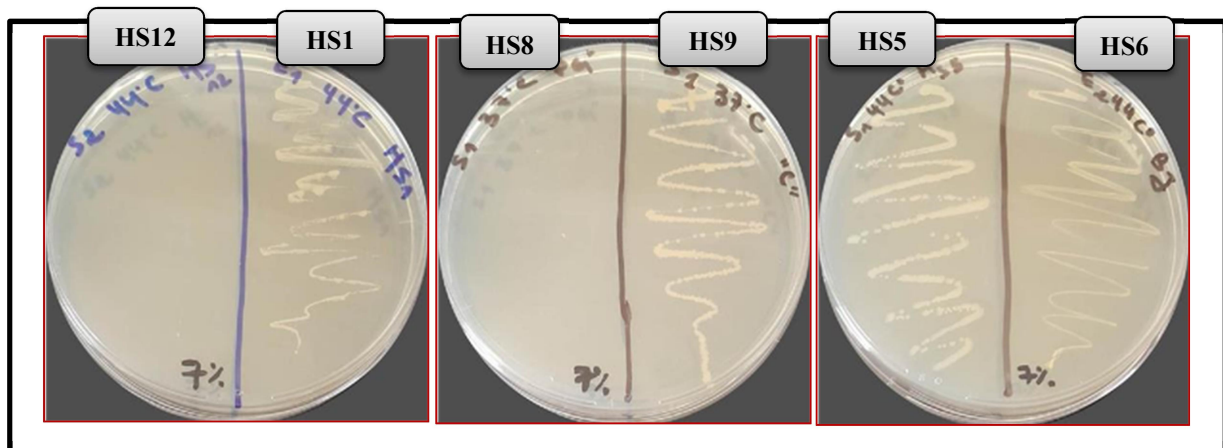


Figure 12: Résultats de la culture des souches à une concentration de 7% de NaCl

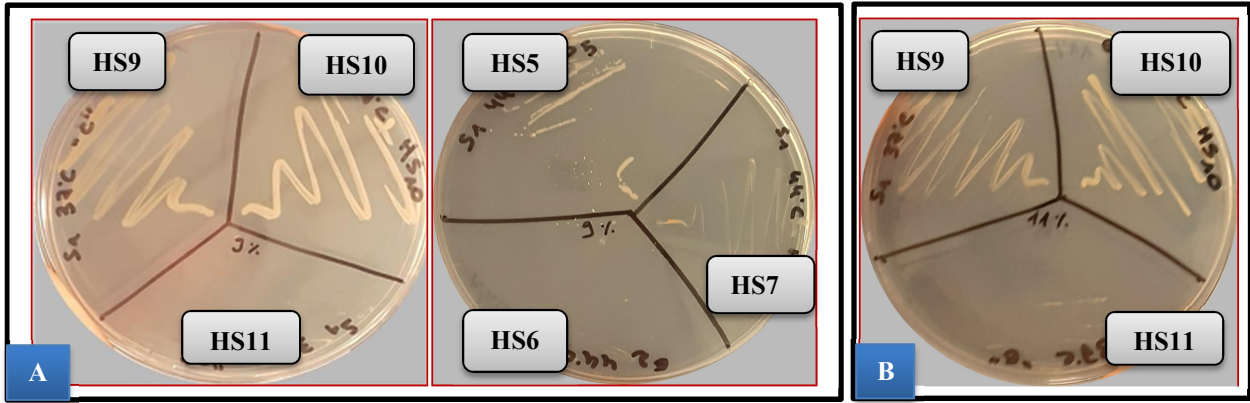


Figure 13: (A) Résultats de la culture des souches à une concentration de 9% de NaCl.  
(B) Résultats de la culture des souches à une concentration de 11% de NaCl.



Figure 14: Résultats de la culture des souches à pH 5.

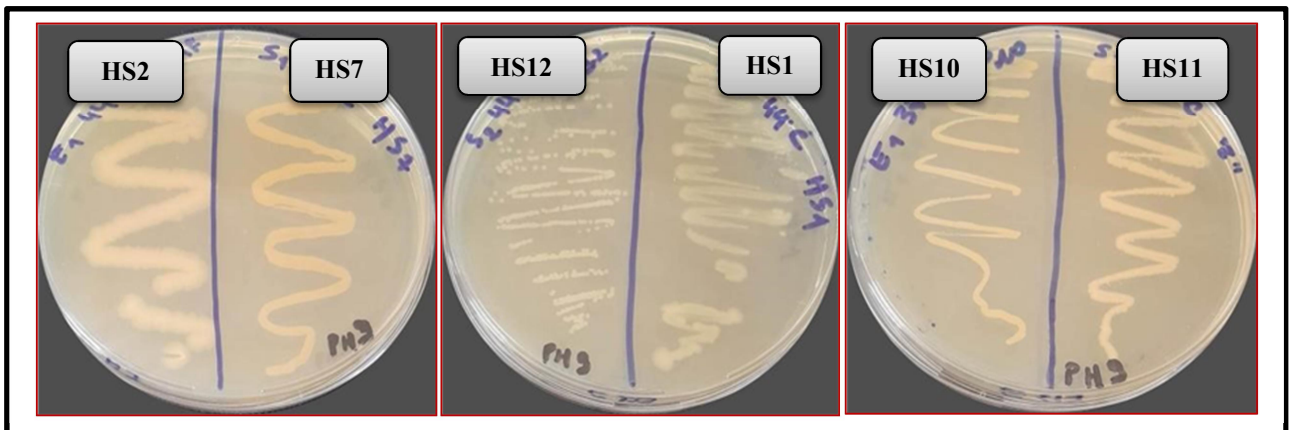


Figure 15: Résultats de la culture des souches à pH 9.

### III Mise en évidence de l'activité enzymatique

La découverte de nouveaux catalyseurs enzymatiques ouvre de nouvelles perspectives d'applications et d'exploitations. L'intérêt porté aux microorganismes vivants dans des environnements extrêmes en particulier les thermophiles a conduit à la découverte d'une diversité extraordinaire d'enzymes originales dotées de propriétés singulières.

Les 14 souches ont été criblées dans le but de révéler leur capacité à produire des enzymes hydrolytiques extracellulaires, notamment l'amylase, la chitinase, la cellulase, la protéase, la lipase, la lécithinase et la lipoprotéinase. D'après les résultats obtenus, 13 souches sont capables de produire de l'amylase cela signifie qu'elles possèdent une activité amylolytique comme le montre le **tableau XIV** et la **figure 16**.

La chitinase est présente chez toutes les souches étudiées, à l'exception de la souche HS5 et HS11. Les 14 souches étudiées possèdent une activité cellulolytique en revanche, la lécithinase est présente que chez trois souches uniquement HS1, HS5 et HS6. Six souches sécrètent une lipoprotéinase: HS1, HS7, HS8, HS9, HS10 et HS12. En ce qui concerne la protéase dix souches produisent cette enzyme (HS1, HS2, HS7, HS8, HS9, HS10, HS11, HS12, HS13 et HS14). En revanche la lipase est présente que chez trois souches HS7, HS10 et HS12.

En 2009, Sharma et ses collaborateurs ont mené une étude sur la caractérisation de souches bactériennes issues de source chaude Soldhar situé dans la région Garhawal en Inde. 13 souches ont été isolées, 7 d'entre elles produisent une amylase, les 13 sécrètent une lipase et aucune activité protéolytique n'a été détectée.

Nous avons observé que quelques isolats ne produisent pas certaines enzymes hydrolytiques extracellulaires. Cela est probablement dû au stress environnemental que subissent ces souches ou bien à la composition du milieu de culture qui ne permet pas le bon développement de la bactérie (milieu très solide, concentration d'agar, nature du substrat).

Tableau XIV: Résultats des activités enzymatiques recherchées.

| Souches | Amylase | Chitinase | Cellulase | Protéase | Lipase | Lécithinases | Lipoprotéinase |
|---------|---------|-----------|-----------|----------|--------|--------------|----------------|
| HS1     | +++     | +++       | +++       | +++      | -      | +            | +              |
| HS2     | +++     | ++        | +++       | +++      | -      | -            | -              |
| HS3     | +++     | +++       | +++       | -        | NE     | NE           | NE             |
| HS4     | ++      | +++       | ++        | -        | NE     | NE           | NE             |
| HS5     | +++     | -         | ++        | -        | -      | +            | -              |
| HS6     | +       | +++       | +++       | -        | -      | +            | -              |
| HS7     | +++     | +++       | ++        | +++      | -      | -            | +              |
| HS8     | ++      | ++        | ++        | +++      | -      | -            | +              |
| HS9     | +++     | ++        | ++        | +++      | +      | -            | +              |
| HS10    | ++      | ++        | +++       | +        | +      | -            | +              |
| HS11    | +++     | -         | ++        | +        | -      | -            | -              |
| HS12    | -       | ++        | +         | +        | +      | -            | +              |
| HS13    | +++     | +++       | +++       | +++      | NE     | NE           | NE             |
| HS14    | +++     | +++       | +         | +++      | -      | -            | -              |

(+++) Très bonne

(++) Bonne

(+) Moyenne

(-) Absence

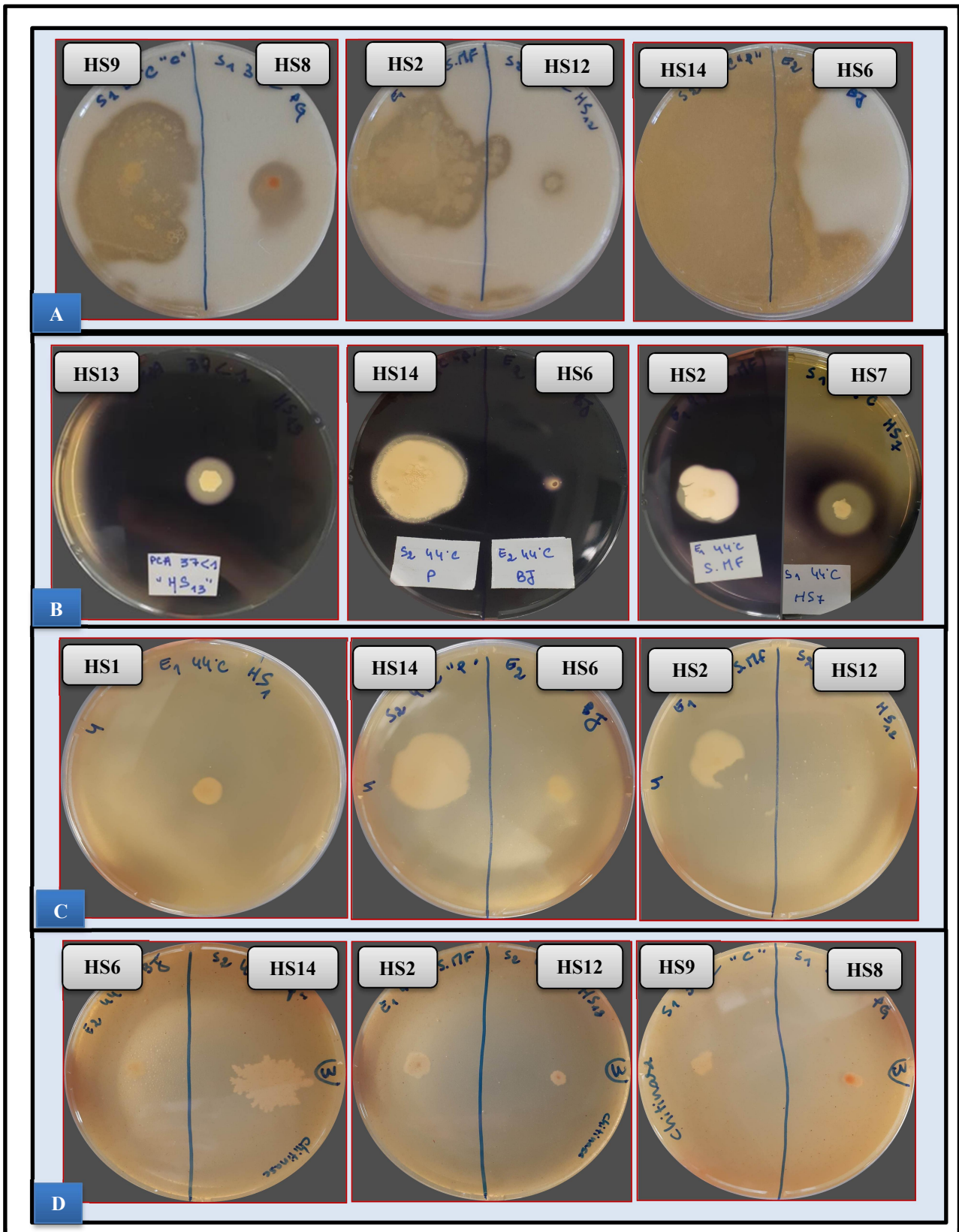
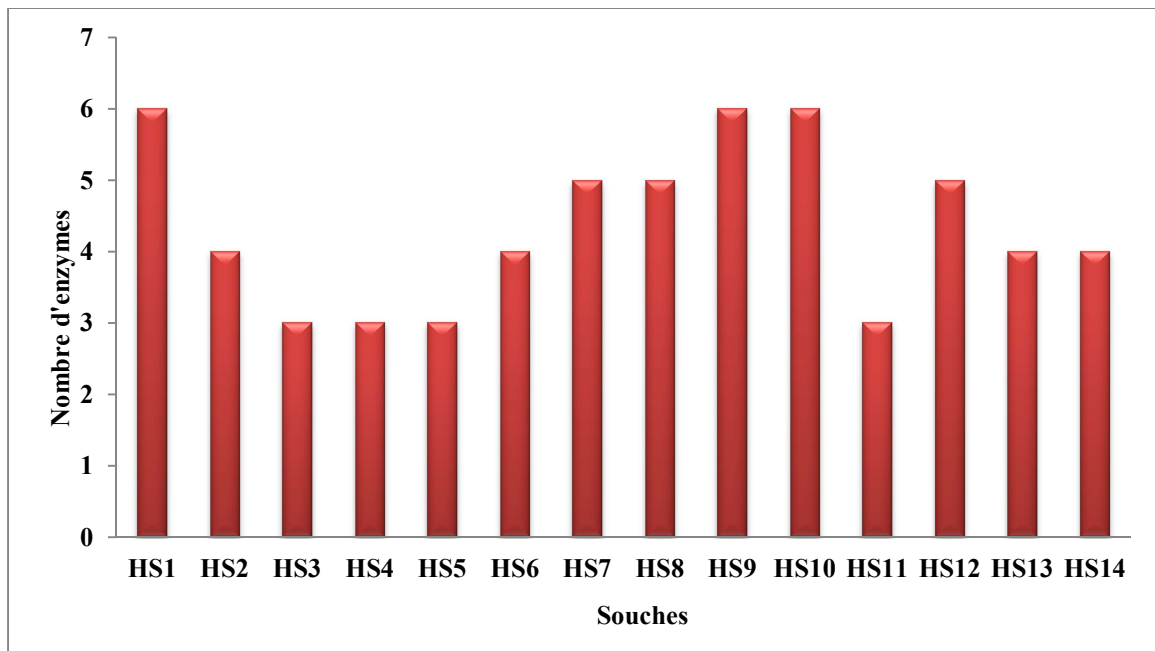
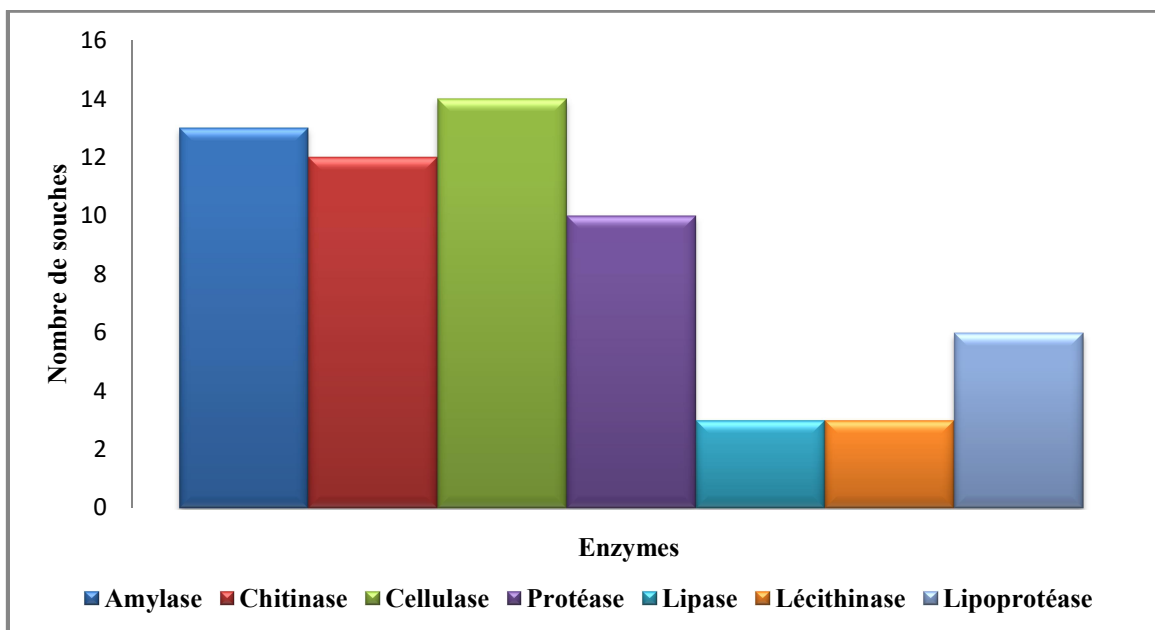


Figure 18: Mise en évidence de l'activité enzymatique chez les souches isolées (A) protéase; (B) amylase; (C) cellulase; (D) chitinase.



**Figure 16: Étude quantitative de la capacité des souches isolées dans la production d'enzymes.**

Par cette représentation graphique, nous pouvons déduire que toutes les souches contiennent au moins 3 enzymes. Les souches HS1, HS9 et HS10 sécrètent six enzymes. Cette diversité d'enzymes retrouvée chez nos souches nous donne un aperçu sur la pauvreté de leur milieu naturel, ce qui a potentiellement poussé ces microorganismes à s'adapter et à utiliser d'autres sources de carbones tels que des matières organiques plus complexes comme source d'énergie alternative. Par ailleurs, les résultats de **Mohammad et al. (2017)** sur une source chaude jordanienne concorde avec nos résultats.

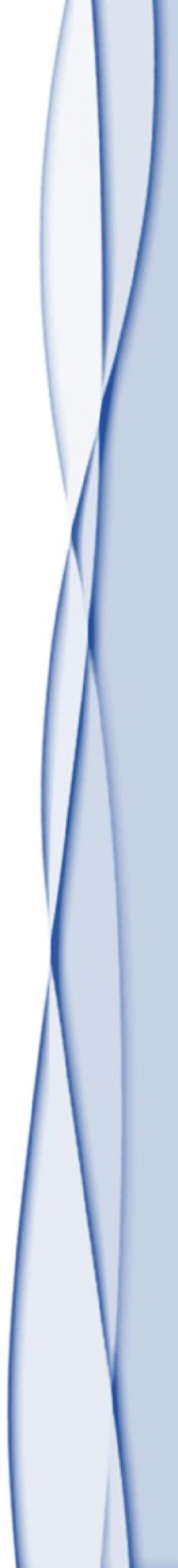


**Figure 17: Étude du type d'enzyme sécrétée par les isolats.**

Sur ce graphe, nous constatons que toutes les souches secrètent les cellulases, 13 souches sont capables de sécréter des amylases et 12 isolats présentent une activité chitinolytique, l'activité protéolytique de ces isolats est présente chez 10 souches seulement. La lipoprotéase est présente chez six souches isolées. Seulement, trois souches sont capables de sécréter la lipase et les lécithinases. De ce fait, nos résultats concordent avec ceux obtenus par Djelouah et Ouhoucine (2022) et ceux d'Atsamnia et ses collaborateurs (2021). En revanche, les résultats de l'étude de Gomri (2012) montrent la prédominance d'activité protéolytique.

Une étude similaire faite au Maroc en 2015 a révélé une dominance du genre *Bacillus*. De plus, 71,25 %, 50,41 % et 5,41 % du total des souches présentaient, respectivement, une forte activité amylolytique, protéolytique ou cellulolytique.

*Conclusion et  
perspectives*



## Conclusion et perspectives

---

Les biotopes chauds représentent un champ de recherche très vaste et prometteur pour les biotechnologies et leurs exploitations thérapeutiques à des fins récréatives, ainsi nommé le thermalisme est très convoité. L'Algérie, le plus vaste pays de l'Afrique du nord, détient une très grande richesse géologique et écologique; il compte plus de 280 sources thermales dont la plupart ne sont pas ou rarement exploitées. Ces sources peuvent être le centre des recherches futures.

Notre choix s'est porté sur la source thermale d'Assif El Hammam dans la wilaya de Bejaïa. Le choix de ce site d'étude n'est pas inopiné car il est considéré comme un environnement chaud très fréquenté par la population Kabyle et non exploité par les scientifiques.

L'analyse physico-chimique de l'eau thermale provenant de la source Assif El Hammam à une température de 45°C et une composition minérale riche en sulfate.

Les résultats de l'évaluation de la qualité sanitaire de l'eau thermale étudiée indiquent l'absence de germes fécaux recherchés (Coliformes, Streptocoques fécaux, *Clostridium* sulfito réducteur) et pathogène (*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*) lors de cette évaluation. Cependant, afin d'obtenir des résultats fiables, il serait préférable d'effectuer au moins deux contrôles par semestre afin de s'assurer de la bonne qualité sanitaire.

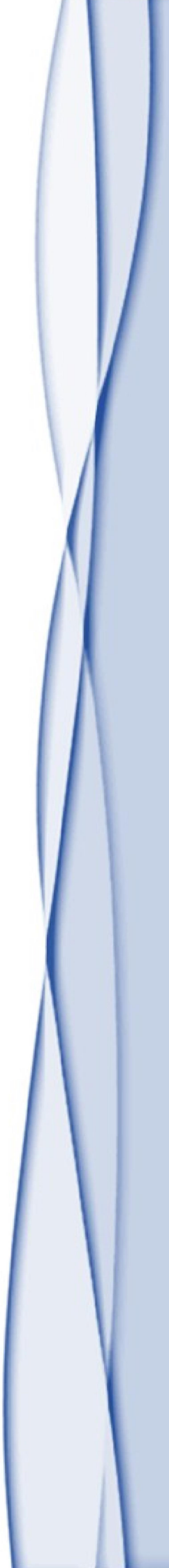
À travers notre étude, nous avons isolé 14 souches dont 12 sont aéro-anaérobies facultatives, une souche est micro-aérophile et une autre est aérobie stricte. Ces souches sont capables de croître à des températures plus ou moins élevées, dans des gammes de salinité variable et à pH optimale, (alcalin et/ ou acide dépendant des souches, en effet les isolats HS6, HS5, HS7 prolifèrent parfaitement à pH 11).

Les isolats obtenus représentent un large éventail d'enzymes extracellulaires et parmi ces dernières on note: les amylases, les cellulases, les chitinases les lécithinases, la lipase, protéase et la lipoprotéinase.

Il serait intéressant à l'avenir de:

- Identifier les souches isolées sur le plan moléculaire par le séquençage de leur ARN S16.
- Doser les activités enzymatiques sur des milieux liquides.
- Caractériser les enzymes les plus performantes.
- Etudier d'autres sources thermales en Kabylie.
- Cibler d'autres biomolécules produites par ces bactéries, notamment les exopolysaccharides, biosurfactants, les antimicrobiens...etc.

*Références  
bibliographiques*



### A

- Aguiar, P., Beveridge, T. J., Reysenbach, A. L. 2004.** *Sulfurihydrogenibium azorense*, sp. nov., a thermophilic hydrogen-oxidizing microaerophile from terrestrial hot springs in the Azores. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 33-39.
- Ait Ouali, A., Issaadi, A., Maizi, D., Ayadi, A., Bouhdjar, A. 2019.** Geothermal potential in the Ouarsenis-Biban-Kabylie (North Central Algeria): Hot spring catalogue. *Arabian Journal of Geosciences*, **12**(23), 741.
- Alain, K. (2003).** *Approches culturelles et moléculaires des assemblages microbiens associés aux polychètes hydrothermaux de la famille Alvinellidae* (Doctoral dissertation, Université de Bretagne Occidentale).
- Allala, F., Bouacem, K., Boucherba, N., Mechri, S., Kriaa, M., Arkoub-Djoudi, W., Azzouz, Z., Benallaoua, S., Hacene, H., Jaouadi, B., Bouanane-Darenfed, 2019.** Purification, biochemical, and molecular characterization of a novel extracellular thermostable and alkaline  $\alpha$ -amylase from *Tepidimonas fonticaldi* strain HB23. *International Journal of Biological Macromolecules*, **132**, 558-574.
- Allala, F. 2020.** Caractérisation d'enzymes thermostables produites par des souches bactériennes d'origine hydrothermale. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene. 117-144.
- Allala, F., Bouacem, K., Boucherba, N., Mechri, S., Kriaa, M., Arkoub-Djoudi, W., Azzouz, Z., Benallaoua, S., Hacene, H., Jaouadi, B., Bouanane-Darenfed, A. 2020.**  $\alpha$ -Amylase production by *Tepidimonas fonticaldi* strain HB23: statistical optimization and compatibility study for use in detergent formulations. *Environmental Science and Pollution Research*, **27**(29), 37164-37172.
- Amarouche-Yala, S., Benouadah, A., El Ouahab Bentabet, A., Moulla, A. S., Ouarezki, S.A., Azbouche, A. 2015.** Physicochemical, bacteriological, and radiochemical characterization of some Algerian thermal spring waters. *Water Quality Exposure and Health*, **7**(2), 233-249.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. 1995.** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, **59**(1), 143-169.
- Amo, T., Paje, M. L., Inagaki, A., Ezaki, S., Atomi, H. 2002.** *Pyrobaculum calidifontis* sp. nov. A novel hyperthermophilic archaeon that grows in atmospheric air. *Archaea*, **1**, 113-121.
- Athamena, M. 2006.** Etude des ressources thermals de l'ensemble allochtone du sud sétifien. These de Doctorat. Université El Hadj Lakhdar de Batna-Algérie, 192p.
- ATSAMNIA, A., BENBOUALI, A., LAOUAMRIA, I., HOCEINI, A. 2022.** *Evaluation de l'activité enzymatique des souches thermophiles isolées à partir des sources thermales dans les wilayas de Médéa, Bouira et Ain defla* (Doctoral dissertation).
- Azadian, F., Badoei-dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A., Hassanshahian, M. 2016.** Purification and biochemical properties of a thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus licheniformis*

AMF-07 and its application for hydrolysis of different cellulosic substrates to bioethanol production. *Molecular Biology Research Communications*, **5**(3), 133-145.

### B

- Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W., Soni, R. 1999.** Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry*, **35**(1-2), 213-219.
- Belghyti, D., El Guamri, Y., Ztit, G., Ouahidi, M., Joti, M., Harchrass, A., Amghar, H., Bouchouata, O., El Kharrim, K., Bounouira, H. 2010.** Caractérisation physico-chimique des eaux usées d'abattoir en vue de la mise en œuvre d'un traitement adéquat: Cas de Kénitra au Maroc. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, **5**(2).
- Ben Salem, R., Fardeau, M. L., Belhadj, O. 2012.** Caractérisation d'une souche bactérienne thermophile d'*Ureibacillus thermosphaericus* isolée à partir de la station thermale de Korbous coproductrice des protéases et amylases. *Association Tunisienne Des Sciences Biologiques*.
- Benammar, L., İnan Bektaş, K., Menasria, T., Beldüz, A. O., Güler, H. I., Bedaida, I. K., Gonzalez, 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.
- Benziada, M. (2022).** The hot springs of central northern Algeria hydro geochemical and therapeutic aspects: Direct applications and Therapeutic Value. *Geothermal Energy*, 79.
- Bhardwaj, K. K., Saun, N. K., & Gupta, R. (2017).** Immobilization of lipase from *Geobacillus* sp. and its application in synthesis of methyl salicylate. *Journal of Oleo Science*, **66**(4), 391-398.
- Bouacem, K., Bouanane-Darenfed, A., Boucherba, N., Joseph, M., Gagaoua, M., Ben Hania, W., Kecha, M., Benallaoua, S., Hacène, H., Ollivier, B., Fardeau, M. L. (2014).** Partial characterization of xylanase produced by *Caldicoprobacter algeriensis*, a new thermophilic anaerobic bacterium isolated from an Algerian hot spring. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **174**, 1969–1981.
- Bouacem, K., Bouanane-Darenfed, A., Jaouadi, N.Z., Joseph, M., Hacene, H., Ollivier, B., Fardeau, M. L., Bejar, S., Jaouadi, B. (2016).** Novel serine keratinase from *Caldicoprobacter algeriensis* exhibiting outstanding hide dehairing abilities. *International Journal of Biological Macromolecules*, **86**, 321-328
- Bouacem, K. 2016.** Caractérisation de souches bactériennes isolées à partir de sources thermales du Nord-Algérien: Etude des propriétés enzymatiques. Thèse de Doctorat en Microbiologie Appliquée, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene. 189.
- Bouacem, K., Laribi-Habchi, H., Mechri, S., Hacene, H., Jaouadi, B., Bouanane Darenfed, A. 2018.** Biochemical characterization of a novel thermostable chitinase from *Hydrogenophilus hirschii* strain KB-DZ44. *International Journal of Biological Macromolecules*, **106**, 338-350.

- Bouacem, K., Amziane-Touazi, M., Hania, W. B., Cayol, J., Fardeau, M., Benayad, T., Hacene, H., Bouanane-Darenfed, A. 2022.** Isolation and characterization of moderately thermophilic aerobic cultivable bacteria from Hammam Righa Hot Spring (Algeria): Description of their hydrolytic capacities. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*, **8**(3), 2533-2545.
- Bouanane-Darenfed, A., Boucherba, N., Bouacem, K., Gagaoua, M., Joseph, M., Kebbouche, G., Nateche, F., Hacene, H., Ollivier, B., Cyol, J L., Fardeau, M. L. (2016).** Characterization of a purified thermostable xylanase from *Caldicoprobacter algeriensis* sp. nov. strain TH7C1<sup>T</sup>. *Carbohydrate Research*, **419**, 60-68.
- Boughlali M. (2003).** Thermalisme et thalassothérapie en Algérie. La presse thermale et climatique, **140**, 161-165.
- Bouraoui, H., Aissa, M.B., Abbassi, F., Touzel, J.P., O'donohue, M., Manai, M. 2012.** Characterization of *Deinococcus sahariens* sp. nov., a radiation-resistant bacterium isolated from a Saharan hot spring. *Archives of Microbiology*, **194**(5), 315-322.
- Bok, J.D., Yernool, D.A., Eveleigh, D.E. 1998.** Purification, characterization, and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(12), 4774-478
- Brock, T. D., Freeze, H. 1969.** *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*, **98**(1), 289-297.
- Bronnenmeier, K., Kern, A., Liebl, W., Staudenbauer, W.L. 1995.** Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(4), 1399-1407.
- Budihal, S.R., Agsar, D., Patil, S.R. 2016.** Enhanced production and application of acidothermophilic *Streptomyces cellulase*. *Bioresource Technology*, **200**, 706-712.

## C

- Capdepu, M., Herblot, S., Counhil, P., Pujol, J., B, C. N., Quentin, C. 1996.** Les *Pseudomonas* et autres bacilles à gram négatif dans les bioglées thermales. *Journal Européen d'Hydrologie*, **27**(2), 193-201.
- Capdepu, M. 1985.** Le contrôle microbiologique des péloïdes. Thèse de Doctorat d'état. Sciences Pharmaceutique. Université de Bordeaux, 205p.
- Castelán-Sánchez, H. G., Meza-Rodríguez, P. M., Carrillo, E., Ríos-Vázquez, D. I., Liñan-Torres, A., Batista-García, R. A., Pérez-Rueda, E.; Rojas-Ruiz, NE., Dávila-Ramos, S. 2020.** The microbial composition in circumneutral thermal springs from Chignahuapan, Puebla, Mexico reveals the presence of particular sulfur-oxidizing bacterial and viral communities. *Microorganisms*, **8**(11), 1677.
- Chandra, P., Enespa, Singh, R., Arora, P. K. 2020.** Microbial lipases and their industrial applications: à comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, **19**, 1-42.

**Chapman, D. V. 1996.** Water quality assessments: a guide to the use of biota, sediments and water in environmental monitoring. CRC Press. 2<sup>nd</sup> edition, 651.

Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec. Recherche et dénombrement des coliformes totaux : méthode par filtration sur membrane. MA. 700 – Col 1.0, Rév. 4, Ministère du Développement durable, de l'Environnement, et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec, 2016, 20 p.

Commissione Europea, Directorate-General for Health & Consumers. Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER). Derogation on the Drinking Water Directive 98/83/EC, 16 April 2010.

### D

**Declais, A. 1997.** Etude mécanistique de la reverse gyrase de *sulfolobus acidocaldarius*, une topoisomérase I hyperthermophile. <http://www.theses.fr/1997ECAP0540>.

**De Castro, M. E., Rodríguez-Belmonte, E., González-Siso, M. I. 2016.** Metagenomics of thermophiles with a focus on discovery of novel thermozymes. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1521.

**Debnath, T., Kujur, R. R. A., Mitra, R., Das, S. K. 2019.** Diversity of microbes in hot springs and their sustainable use. *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications: Volume 1. Microbial Diversity in Normal & Extreme Environments*, 159-186.

**De Vos, P., Garrity, G. M. 2009.** *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer.

**Dul'Tseva, N. M., Tourova, T. P., Spiridonova, E. M., Kolganova, T. V., Osipov, G. A., Gorlenko, V. M. 2006.** *Thiobacillus sajanensis* sp. nov., a new obligately autotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from Khito-Gol hydrogen-sulfide springs, Buryatia. *Microbiology*, 75, 582-592.

**Dumorné, K., Córdova, D. C., Astorga-Eló, M., Renganathan, P. 2017.** Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(4), 649–659.

**Duriez, A. 2006.** Origine et processus minéralisation d'eaux thermales en milieu continentale méditerranée: cas du système géothermale des thermopyles (Giéce). Thèse de doctorat Faculté des Sciences d'Orsay, Université Paris Sud 11, France, 292p.

### F

**Fatma, S., Hameed, A., Noman, M., Ahmed, T., Shahid, M., Tariq, M., Tabassum, R. (2018).** La biomasse lignocellulosique: une source de bioénergie durable pour l'avenir. *Lettres protéiques et peptidiques*, 25 (2), 148-163.

**Fekraoui, A., Abouriche, A. 1999.** Ressources Géothermiques du Nord de l'Algérie-Eléments de l'Atlas Géothermique. *Revue des Energies Renouvelables*, 159-162.

**Fekraoui, A., Kedaid, F. Z. 2005, April.** Geothermal resources and uses in Algeria: A country update report. In *Proceedings of the World Geothermal Congress* (pp. 1-8).

**Ferrera, I., Reysenbach, A. L. 2007.** Thermophiles. *Els*.

### G

**Giddings, L. A., Newman, D. J. 2022.** Extremophilic fungi from marine environments: underexplored sources of antitumor, anti-infective and other biologically active agents. *Marine Drugs*, **20**(1), 62.

**Gomri, M. A., Kharroub, K. 2012.** *Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermales terrestres de l'Est Algérien* (Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri-Constantine 1).

**Goodfellow, M., Williams, S. T. 1983.** Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, **37**(1), 189-216.

**Goorissen, H. P., Boschker, H. T., Stams, A. J., Hansen, T. A. 2003.** Isolation of *thermophilic Desulfotomaculum* strains with methanol and sulfite from solfataric mud pools, and characterization of *Desulfotomaculum solfataricum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**(5), 1223-1229.

**Guézennec, J., Rocchiccioli, F., Maccaron-Gomez, B., Khelifa, N., Dussauze, J., Rimbault, A. 1998.** Occurrence of 3-hydroxyalkanoic acids in sediments from the Guaymas basin (Gulf of California). *FEMS Microbiology Ecology*, **26**(4), 335-344.

**Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B. 2003.** Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, **38**(11), 1599-1616.

**Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. 2002.** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59**(1), 15-32.

**Guiraud, J., Rosec, J.P. 2004.** *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. Edition AFNOR.1585p.

### H

**Hacène, H. 2016.** *Microbiologie fondamentale et appliquée*. Édition Houma. 918p.

**Houti, A., Benbrahim, K. F., Lalami, A. E. O., Zbadi, L., Rachiq, S. 2014.** Qualité physicochimique et bactériologique de trois stations thermales dans les régions de Fès, Maroc. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, **10**(4), 158-168.

**Hug, K., Maher, W. A., Stott, M. B., Krikowa, F., Foster, S., Moreau, J. W. 2014.** Microbial contributions to coupled arsenic and sulfur cycling in the acid-sulfide hot spring Champagne Pool, New Zealand. *Frontiers in Microbiology*, **5**, 569.

Hussein, E. I., Jacob, J. H., Shakhathreh, M. A. K., Abd Al-razaq, M. A., Juhmani, A. S. F., Cornelison, C. T. 2017. Exploring the microbial diversity in Jordanian hot springs by comparative metagenomic analysis. *MicrobiologyOpen*, **6**(6), e00521.

Hwang, B. K., Lim, S. W., Kim, B. S., Lee, J. Y., Moon, S. S. 2001. Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(8), 3739-3745.

### I

Issaadi, A. 1992. Le thermalisme dans son cadre géostructural, apports à la connaissance de la structure profonde de l'Algérie et de ses ressources géothermales, Thèse de Doctorat d'état en géologie, IST, USTHB, 274 p.

### J

Jaenicke, R., Sterner, R. 2006. Life at high temperatures. in: *The Prokaryotes*, Springer, 167-209.

Al-Johani, N. B., Al-seeni, M. N., Ahmed, Y. M. 2016. Optimization of alkaline  $\alpha$ -amylase production by thermophilic *Bacillus subtilis*. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, **14**(1), 288-301.

Johnson, D. B., Okibe, N., Roberto, F. F. 2003. Novel thermo-acidophilic bacteria isolated from geothermal sites in Yellowstone National Park: physiological and phylogenetic characteristics. *Archives of Microbiology*, **180**, 60-68.

José-Miguel, C.E.I., Valerio, S., Petrovich, I., Gerasimo, V., Denys, C.J., Aklano, G., Fairbridge, R., Zullini, A., Ponnam-Peruma, C., Leonardi, C. 1989. La nature: Grottes, Geysers et Glaciers. **8**, 139-141.

### K

Khelifi, N., Ben Romdhane, E., Hedi, A., Postec, A., Fardeau, M. L., Hamdi, M., Hirschler-Réa, A. 2010. Characterization of *Microaerobacter geothermalis* gen. nov., sp. nov., a novel microaerophilic, nitrate- and nitrite-reducing thermophilic bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Tunisia. *Extremophiles*, **14**, 297-304.

Krahe, M., Antranikian, G., Märkl, H. 1996. Fermentation of extremophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, **18**(2-3), 271-285.

Kumar, H. D., Swati, K. 2001. *Modern concepts of microbiology*. Vikas Publishing House.

Kumar, S., Dangi, A. K., Shukla, P., Baishya, D., Khare, S. K. 2019. Thermozyms: adaptive strategies and tools for their biotechnological applications. *Bioresource Technology*, **278**, 372-382.

### L

- Lalmanach, G. 2008.** Proteolytic enzymes: from structures to transporpathways. *Biochimie*, **90**(2), 191-193.
- Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A., Lant, P. 2013.** The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*, **38**(3), 536-583.
- Lee, Y. J., Wagner, I. D., Brice, M. E., Kevbrin, V. V., Mills, G. L., Romanek, C. S., Wiegel, J. 2005.** *Thermosediminibacter oceani* gen. nov., sp. nov. and *Thermosediminibacter litoriperuensis* sp. nov., new anaerobic thermophilic bacteria isolated from Peru Margin. *Extremophiles*, **9**, 375-383.
- Lee, Y. J., Romanek, C. S., Mills, G. L., Davis, R. C., Whitman, W. B., Wiegel, J. 2006.** *Gracilibacter thermotolerans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermotolerant bacterium from a constructed wetland receiving acid sulfate water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**(9), 2089-2093.
- Liu, L., Salam, N., Jiao, J. Y., Jiang, H. C., Zhou, E. M., Yin, Y. R., Ming, H., Li, W. J. 2016.** Diversity of culturable thermophilic actinobacteria in hot springs in Tengchong, China and studies of their biosynthetic gene profiles. *Microbial Ecology*, **72**, 150-162.
- Lewison, R. L., Freeman, S. A., Crowder, L. B. 2004.** Quantifying the effects of fisheries on threatened species: the impact of pelagic longlines on loggerhead and leatherback sea turtles. *Ecology Letters*, **7**(3), 221-231.
- Li, M. F., Yang, S., Sun, R. C. 2016.** Recent advances in alcohol and organic acid fractionation of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, **200**, 971-980.

### M

- Madigan, M., Martinko, J. 2007.** Biologie des micro-organismes. 11<sup>ème</sup> édition.
- Menzel, P., Gudbergdottir, S., Rike, A. G., Lin, L., Zhang, Q., Contursi, P., Moracci, M., Kristjansson, J. K., Bolduc, B., Gavrillov, S., Ravin, N. V., Mardanov, A. V., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Young, M. J., Krogh, A., Peng, X. 2015.** Comparative Metagenomics of Eight Geographically Remote Terrestrial Hot Springs. *Microbial Ecology*, **70**(2), 411-424.
- Mhiri, S., Bouanane-Darenfed, A., Jemli, S., Neifar, S., Ameri, R., Mezghani, M., Bejar, S. 2020.** A thermophilic and thermostable xylanase from *Caldicoprobacter algeriensis*: Recombinant expression, characterization and application in paper biobleaching. *International Journal of Biological Macromolecules*, **164**, 808-817.
- Mohammad, B. T., Al Daghistani, H. I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., Kennes, C. 2017.** Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Jordanian hot springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* isolates as potential producers of thermostable enzymes. *International Journal of Microbiology*. <https://doi.org/2017/6943952>.

## Références bibliographiques

**Mokrane, S., Bouras, N., Meklat, A., Lahoum, A., Zitouni, A., Verheecke, C., Klenk, H. P. 2016.** *Thermoactinomyces khenchelensis* sp. nov., a filamentous bacterium isolated from soil sediment of a terrestrial hot spring. *Antonie van Leeuwenhoek*, **109**, 311-317.

### P

**Pandey, A., Dhakar, K., Sharma, A., Priti, P., Sati, P., Kumar, B. 2015.** Thermophilic bacteria that tolerate a wide temperature and pH range colonize the Soldhar (95 C) and Ringigad (80 C) hot springs of Uttarakhand, India. *Annals of Microbiology*, **65**(2), 809-816.

**Potprommanee, L., Wang, X., Han, Y., Nyobe, D., Peng, Y., Huang, Q., Liu, J., Liao, Y., Chang, K. 2017.** Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass. *PLoS one*, **12**(4), e0175004.

**Prakash, O., Jaiswal, N. 2010.**  $\alpha$ -Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **160**, 2401-2414.

### Q

**Quérellou, J., & Guézennec, J. (2010).** Biotechnologie des extrêmophiles. *Techniques de l'Ingenieur*, 1-13.

### R

**Rabbani, M., Bagherinejad, M. R., Sadeghi, H., Shariat, Z. S., Etemadifar, Z., Moazen, F., Rahbari, M., Mafakher, L., Zaghian, S. 2013.** Isolation and characterization of novel thermophilic lipase-secreting bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, **44**(4), 1113-1119.

**Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., Gautieri, A. 2018.** Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL Bioengineering*, **2**(1), 011501.

**Rodier J., Bazin C., Broutin J-P., Chambon P., Champsau H., Rodi L. 2005:** L'analyse de l'eau: eau naturelle, résiduaire, eau de mer, 8<sup>ème</sup> Ed.pp:130-151.

### S

**Saeed, A. M., El-Shatoury, E. H., Sayed, H. A. 2021.** Statistical factorial designs for optimum production of thermostable  $\alpha$ -amylase by the degradative bacterium *Parageobacillus thermoglucosidasius* Pharon1 isolated from Sinai, Egypt. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, **19**, 1-9.

**Saibi, H. 2015.** Geothermal resources in Algeria. Proceedings in World Geothermal Congress 2015, Melbourne, Australia, 19–24 April.

**Saghatelyan, A., Margaryan, A., Panosyan, H., Birkeland, N. K. 2021.** Microbial diversity of terrestrial geothermal springs in Armenia and Nagorno-Karabakh: a review. *Microorganisms*, **9**(7), 1473.

## Références bibliographiques

- Sahoo, K., Sahoo, R. K., Gaur, M., Subudhi, E. 2020.** Cellulolytic thermophilic microorganisms in white biotechnology: a review. *Folia Microbiologica*, **65**(1), 25-43.
- Saibi, H. 2009.** Geothermal resources in Algeria. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **13**(9), 2544-2552.
- Sang, P., Liu, S. Q., Yang, L. Q. 2020.** New insight into mechanisms of protein adaptation to high temperatures: A comparative molecular dynamics simulation study of thermophilic and mesophilic subtilisin-like serine proteases. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(9), 3128.
- Satyanarayana, T., Littlechild, J. A., Kawarabayasi, Y. 2013.** Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology. In *Springer eBooks*.
- Schoeller, H. 1962.** *Les eaux souterraines: hydrologie dynamique et chimique, recherche, exploitation et évaluation des ressources*, Edition Masson et C<sup>ie</sup>, Paris, 579 p.
- Sharma, A., Pandey, A., Shouche, YS, Kumar, B. et Kulkarni, G. (2009).** Caractérisation et identification de *Geobacillus* spp. Isolé du site de la source chaude Soldhar de Garhwal Himalaya, Inde. *Tourillon de microbiologie fondamentale*, **49** (2), 187-194.
- Simon-Colin, C., Raguénès, G., Cozien, J., Guézennec, J. 2008.** *Halomas profundus* sp. nov., a new PHA-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Journal of Applied Microbiology*, **104**(5), 1425-1432.
- Steinsbu, B. O., Tindall, B. J., Torsvik, V. L., Thorseth, I. H., Daae, F. L., Pedersen, R. B. 2011.** *Rhabdothermus arcticus* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Thermaceae* isolated from a hydrothermal vent chimney in the Soria Moria vent field on the Arctic Mid-Ocean Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **61**(9), 2197-2204.
- Song, J., Weon, H. Y., Yoon, S. H., Park, D. S., Go, S. J., Suh, J. W. 2001.** Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinomyces* spp. isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiology Letters*, **202**(1), 97-102.
- Soy, S., Nigam, V. K., Sharma, S. R. 2019.** Cellulolytic, amylolytic and xylanolytic potential of thermophilic isolates of Surajkund hot spring. *Journal of Biosciences*, **44**, 1-12.

## T

- Te'o, V., Saul, D., Bergquist, P. 1995.** celA, another gene coding for a multidomain cellulase from the extreme thermophile *Caldocellum saccharolyticum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **43**(2), 291-296.
- Thapa S., Li H., Ohair J., Bhatti S., Chen F-C., Nasr KA., Nasr KA., Johnson T. and Zhou S. 2019.** Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular Biotechnology*, **61**, pp: 579-601.

### V

- Valeriani, F., Protano, C., Gianfranceschi, G., Leoni, E., Galasso, V., Mucci, N., Vitali, M., Romano Spica, V. 2018.** *Microflora Thermarum* Atlas project: biodiversity in thermal spring waters and natural SPA pools. *Water Supply*, **18**(4), 1472- 1483.
- Vavitsas, K., Glekas, P. D., Hatzinikolaou, D. G. 2022.** Synthetic Biology of Thermophiles: Taking Bioengineering to the Extremes? *Applied Microbiology*, **2**(1), 165-174.
- Verma, S., Meghwanshi, G. K., Kumar, R. 2021.** Current perspectives for microbial lipases from extremophiles and metagenomics. *Biochimie*, **182**, 23-36.
- Viville, J. 1983,** Etude hydrogéologique du massif de L'Etang de Lers (Pyrénées ariégeoises).

### W

- Wu, H., Liu, B. 2016.** *Nonomuraea thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant actinomycete isolated from mushroom compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **66**(2), 894-900.
- Wetzel, R.G. 2001.** *Limnologie : écosystèmes lacustres et fluviaux*. édition professionnelle du golfe.

### X

- Xu, L., Li, Q., Jiang, C. 1996.** Diversity of soil actinomycetes in yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(1), 244-248.

### Y

- Yang, Y., Wang, Y., Yang, S., Liang, Z., Liu, G., Chen, Y. 2012.** A review: Thermophiles and their working mechanisms in degrading excess sludge. *Journal of Applied Ecology*, **23**(7), 2026-2030.

### Z

- Zarafeta, D., Kissas, D., Sayer, C., Gudbergsdottir, S.R., Ladoukakis, E., Isupov, M.N., Chatziioannou, A., Peng, X., Littlechild, J.A., Skretas, G. 2016.** Discovery and characterization of a thermostable and highly halotolerant GH5 cellulase from an Icelandic hot spring isolate. *PloS One*, **11**(1), e0146454.
- Zverlov, V., Mahr, S., Riedel, K., Bronnenmeier, K. 1998.** Properties and gene structure of a bifunctional cellulolytic enzyme (CelA) from the extreme thermophile *Anaerocellum thermophilum* with separate glycosyl hydrolase family 9 and 48 catalytic domains. *Microbiology*, **144**(2), 457-465.

### Webographie

[1]:[En ligne] <https://www.researchgate.net/figure/schema-simplifie-de-la-circulation-hydrothermale-aux-dorsales-oceaniques-Le-projet>.

[2]: Figure 1 : [En ligne] [https://es.wikipedia.org/wiki/Fuente\\_hidroterma](https://es.wikipedia.org/wiki/Fuente_hidroterma).

[3]: En ligne] <https://fr.wikipedia.org/wiki/>. Date: 02/06/2023. Heure: 16: 06.

[4]: [En ligne] <https://volcanoesland.com/attractions/uzon-caldera>. Date: 02/06/2023. Heure:17:20.

[5]: [En ligne] <https://eugene.kaspersky.fr> Date: 02/06/2023. Heure: 18: 00.

[6]: [https://fr.wikipedia.org/wiki/Assif\\_El\\_Hammam#/maplink/1](https://fr.wikipedia.org/wiki/Assif_El_Hammam#/maplink/1).

# *Annexes*



## Annexe 1

Tableau A: Matériels et appareillages utilisés.

| Appareils  | Verreries  | Milieux   |
|--|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>-Agitateur chauffant à barreau magnétique</li> <li>-Autoclave</li> <li>-Étuve</li> <li>-Bain Marie</li> <li>-Balance analytique (DSAE-001)</li> <li>-Chambre froide (4°)</li> <li>-Microscope photonique</li> <li>-Pied à coulisse électronique</li> <li>-Compteur de colonies</li> <li>-Rampe de filtration</li> <li>-Appareil multi-usage (multi 3430)</li> <li>-pH mètre</li> <li>-Plaque chauffante(Schott)</li> <li>-Distillateur</li> <li>-Hôte à UV (TEISSTAR)</li> <li>-Vortex</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Bec Bunsen</li> <li>-Boites Petri</li> <li>-Pipettes Pasteur</li> <li>-Anse à fil droit</li> <li>-Erlenmeyer</li> <li>-Éprouvette</li> <li>-Falcon en verre</li> <li>-Bandelettes colorimétriques</li> <li>-Becher</li> <li>-Spatule</li> <li>-Fiole jaugée</li> <li>-Entonnoir de filtration</li> <li>-Papier filtre</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Gélose nutritive</li> <li>-Agar Agar</li> <li>-Gélose Plate Count Agar (PCA)</li> <li>- Amidon soluble</li> <li>-Chitine colloïdale</li> <li>-Jaune d'œufs</li> <li>-Lait à 0% de matière grasse</li> <li>- Carboxyméthylcellulose (CMC)</li> <li>-Mannitol</li> <li>-Bouillon nitraté</li> <li>-Viande-foie</li> </ul> |

Annexe 2



**Microscope photonique**



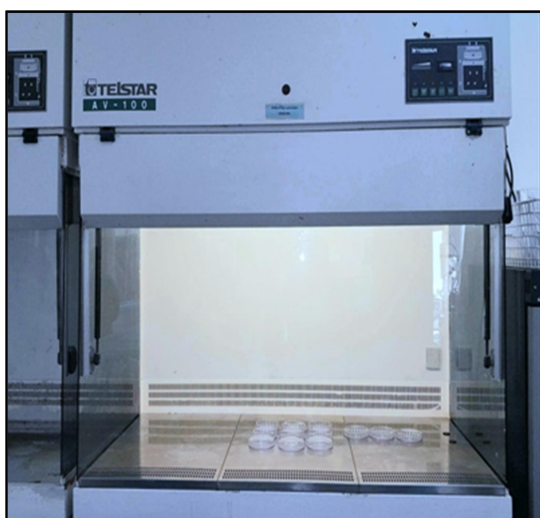
**Spectrophotomètre  
d'adsorption atomique**



**Appareil multi usage**



**pH mètre**



**Hôte a UV (TEISSTAR)**



**Autoclave**

## Annexe 3

Tableau B: Métaux lourds recherchés et leurs réactifs.

| Métaux lourds | Réactifs   |
|---------------|--|
| Cu            | CH <sub>3</sub> COOH (Acide acétique) + K <sub>4</sub> [Fe(CN) 6] (Ferrocyanure de potassium)                              |
| Zn            | HCl (Acide chlorhydrique) + K <sub>4</sub> [Fe(CN) 6] (Ferrocyanure de potassium)  |
| Fe            | K <sub>4</sub> [Fe(CN) 6] (Ferrocyanure de potassium)  |
| Cr            | CH <sub>3</sub> COOH (Acide acétique) + Pb (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (Acétate de plomb) |
| Cd            | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NS (Thio-acétamide)  |
| Pb            | KI (Iodure de potassium)   |

## Annexe 4

## Technique de la coloration de Gram

Réaliser un frottis bactérien et le fixer à la flamme, le recouvrir avec la solution de violet de Gentiane, laisser agir 1 minute et rincer à l'eau. Par la suite, inonder la lame avec le Lugol, laisser agir 45 secondes deux fois. Puis rincer à l'eau et décolorer à l'alcool 95° pendant 30 secondes, refaire le rinçage ensuite submerger la lame par la solution de Fuchsine, laisser agir 1 minute. Rincer abondamment à l'eau, égouttée, sécher entre deux feuilles de papier buvard très propres. Enfin, observer aux grossissements (X40) puis (X100) en ajoutant une goutte d'huile à immersion.

## Annexe 5

Tableau C: Tableau de lecture de la galerie API 20E

| Tests            | Substrat                       | Caractère recherché           | Résultats                                      |                           |
|------------------|--------------------------------|-------------------------------|--|---------------------------|
|                  |                                |                               | Négatif  | Positif                   |
| ONPG             | Ortho-Nitro-phenyl Galactoside | $\beta$ -galactosidase        | Incolore                                       | Jaune                     |
| ADH              | Arginine                       | Arginine di hydrolase         | Jaune  | Rouge / orangé            |
| LDC              | Lysine                         | Lysine décarboxylase          | Jaune  | Rouge / orangé            |
| ODC              | Ornithine                      | Ornithine décarboxylase       | Jaune  | Rouge / orangé            |
| CIT              | Citrate de sodium              | Utilisation du citrate        | Vert pâle / jaune                              | Bleu-vert / bleu          |
| H <sub>2</sub> S | Thiosulfate de Sodium          | Production d'H <sub>2</sub> S | Incolore / grisâtre                            | Dépôt noir / fin liseré   |
| URE              | Urée                           | Uréase                        | Jaune  | Rouge / orangé            |
| TDA              | Tryptophane                    | Tryptophane désaminase        | Rréactif chlorure de fer III lecture immédiate |                           |
|                  |                                |                               | Jaune  | Marron foncé              |
| IND              | Tryptophane                    | Production d'indole           | Quelque goutte de réactif Kovacs               |                           |
|                  |                                |                               | Jaune  | Anneau rouge              |
| VP               | Pyruvate desodium              | Production d'acétone          | Réactifs VP 1 et VP 2, lecture après 10 min    |                           |
|                  |                                |                               | Incolore                                       | Rose / rouge              |
| GEL              | Gélatine de Khon               | Gélatinasse                   | Pas de diffusion                               | Diffusion du pigment noir |
| GLU              | Glucose                        | Fermentation Ou oxydation     | Bleu / bleu-vert                               | Jaune                     |
| MAN              | Mannitol                       |                               |  |                           |
| INO              | Inositol                       |                               |  |                           |
| SOR              | Sorbitol                       |                               |  |                           |
| RHA              | Rhamnose                       |                               |  |                           |
| SAC              | Saccharose                     |                               |  |                           |
| MEL              | Melibiose                      |                               |  |                           |
| AMY              | Amygdaline                     |                               |  |                           |
| ARA              | Arabinose                      |                               |  |                           |

## Annexe 6

Tableau D: Tests biochimiques effectués pour l'identification des souches isolées (Marchal et al., 1987; Guiraud et Rosec, 2004)

| Tests  | Principes   | Techniques   | Lectures   |
|--|---|--|--|
| <b>Etude du métabolisme énergétique</b>            |   |  |  |
| <b>Catalase</b>                                    | <p>La catalase est une enzyme qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée en eau et oxygène</p> $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ <p>Elle empêche l'accumulation de l'<math>\text{H}_2\text{O}_2</math> qui est issue de la voie respiratoire oxydative des bactéries.</p> | La méthode consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée puis à l'aide d'une pipette boutonnée étaler l'inoculum bactérien.  | Apparition de bulles d'air et dégagement gazeux : Présence de l'enzyme.  |
| <b>Oxydase</b>                                     | <p>Ce test permet de mettre en évidence la présence du cytochrome oxydase, une enzyme catalysant une réaction d'oxydo-réduction.</p> <p>Cette enzyme est capable d'oxyder le réactif N diméthyle paraphénylene diamine en dérivé violet.</p>  | Déposer sur un carré d'oxydase l'oculonie à tester et laisser agir. Après quelques secondes observer l'apparition ou pas de la couleur violette.   | Une coloration violette traduit la présence de l'oxydase.  |
| <b>Nitrate Réductase</b>                           | La Nitrate Réductase est capable de catalyser la réaction de réduction de Nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) en Nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et chez certaines bactéries en azote ( $\text{N}_2$ ).   | Réaliser une culture dans un bouillon nitrate. Incuber à 60°C pendant 24-48 h. Ajouter au moment de la lecture quelques gouttes des réactifs de Griess NR I (acide sulfanilique) et NR II ( $\alpha$ naphthylamine). En l'absence de nitrites, rechercher la disparition des nitrates par addition de zinc (épreuve de Zobel). | Le virage immédiat de la couleur du jaune en rouge nous indique que la souche est NR+. Si le milieu reste inchangé (jaune), on ajoute alors de la poudre de Zinc. S'il devient rouge le test est négatif, inchangé donc la souche est NR+ (stade $\text{N}_2$ ). |
| <b>Etude du métabolisme glucidique</b>             |   |  |  |
| <b>Type de métabolisme Oxydatif ou fermentaire</b> | Les bactéries peuvent utiliser les glucides par deux voies métaboliques: Oxydative et fermentaire.  | Ensemencer sur MEVAG deux tubes par piqûre centrale la colonie à tester, recouvrir l'un des tubes d'huile de vaseline pour créer l'anaérobiose puis incuber à 60°C pendant 24 à 48h.   | Métabolisme oxydatif: Acidification (virage au jaune) dans le tube sans la vaseline. Métabolisme fermentaire: acidification rapide dans les deux tubes   |

Tableau D: Tests biochimiques effectués pour l'identification des souches isolées (Marchal et al., 1987; Guiraud et Rosec, 2004) suite.

| Tests   | Principes   | Techniques   | Lectures   |
|---|---|--|--|
| <b>Métabolisme glucidique<br/>(Test VP et RM)</b>   | L'étude des produits terminaux de la glycolyse consiste à faire une différenciation entre la fermentation butylène glycolique (test de Voges Proskauer) et la fermentation acides mixtes (test au Rouge de Méthyl). | Ensemencer sur le milieu Clarck et Lubs la souche bactérienne à étudier et incubé 24h à 48h à 60°C.<br>Après l'incubation. répartir ce tube en 2 autres : l'un servira à la recherche des acides mixtes et l'autre à la recherche de l'acétone. Ajouter respectivement dans chaque tube 2 gouttes de rouge méthyle RM et quelques gouttes des réactifs VPI (napht-1-ol en solution éthanol) et VPII (hydroxyde de Potassium ou de sodium). | Si le milieu vire vers le rouge, la souche est RM+.<br><br>Si la réaction se traduit par un virage du milieu au rouge, la souche est VP+.  |
| <b>Dégradation des sucres<br/>production d'H<sub>2</sub>S et de gaz<br/>sur TSI (Triple Sugar Iron)</b> | Le milieu TSI permet l'étude de la fermentation de 3 sucres (glucose, lactose et saccharose), ainsi que la production d'H <sub>2</sub> S et de gaz.   | Ensemencer par piqûre centrale le culot et par stries la pente puis incubé à 60°C pendant 24 à 48h.  | Pente vire au jaune : La souche est Lac+, Sac+. Culot vire au jaune: La souche est Glu+. Décollement de la gélose: La souche est Gaz+. Noircissement du milieu dans la zone joignant le culot à la pente: La souche est H <sub>2</sub> S+. |
| <b>Mannitol-Mobilité</b>  | Le milieu Mannitol-Mobilité est utilisé pour rechercher la dégradation du mannitol et la mobilité d'une souche.   | Ensemencer la souche à tester par piqûre centrale le milieu Mannitol-mobilité puis incubé 24-48h à 60°C.   | Acidification (virage au jaune): dégradation du mannitol. Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble.   |
| <b>Etude du métabolisme protéique</b>   |   |  |  |
| <b>Production d'indole</b>  | Certaines bactéries ont la particularité de produire de l'indole à partir du tryptophane.   | Ensemencer une culture dans une eau peptonée exempte d'indole puis incubé à 60°C pendant 24h. Après incubation ajouter quelques gouttes de Kovacs.   | Une réaction positive se traduit par la formation d'un anneau rouge, la souche étudiée produit de l'indole.  |
| <b>Etude du métabolisme des acides organiques</b>   |   |  |  |
| <b>Citrate perméase</b>   | Seules les bactéries possédant le citrate perméase sont capables de se développer sur ce milieu.<br>L'utilisation du citrate se traduit par une alcalinisation du milieu.   | Ensemencer en surface par stries serrées et longitudinales la pente du milieu à l'aide d'une pipette chargée de la souche à étudier puis incubé à 60°C pendant 2 à 3 jours.  | Le virage de l'indicateur au bleu indique une alcalinisation du milieu donc la présence de l'enzyme: Bactérie citrate positif.   |

## Annexe 7

Tableau E: Résultat de la galerie API 20E des souches isolées des eaux de Assif El Hammam.

| Tests<br>Souches |      |     |     |     |     |     |     |     |     |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                  | ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H2S | URE | TDA | IND | VP | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA |
| HS1              | -    | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -  | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| HS2              | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| HS3              | -    | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | +   |
| HS4              | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| HS5              | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| HS6              | +    | +   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | +  | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +   |
| HS7              | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| HS8              | -    | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | +   |
| HS9              | +    | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| HS10             | -    | +   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -  | -   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   |
| HS11             | +    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| HS12             | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| HS13             | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| HS14             | +    | -   | -   | -   | +   | -   | +   | -   | -   | +  | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |

(-) : résultat négatif

(+) : résultat positif

## Résumé

En Algérie, il existe plus de 280 sources chaudes réparties à travers le pays, ce nombre augmente au fur et à mesure que nous nous dirigeons vers le Nord-Est. Ces écosystèmes offrent un environnement propice pour mener des recherches sur de nouvelles souches thermophiles. En effet, ces dernières sont capables de produire des biomolécules intéressantes, notamment des enzymes. Notre travail a porté sur la caractérisation physico-chimique et l'évaluation de la qualité sanitaire des eaux thermales d'Assif El Hammam dans la daïra d'Adekar (wilaya de Bejaïa), et la recherche des bactéries à intérêt biotechnologique. L'analyse physico-chimique a révélé une composition minérale diverse, aucun germe pathogène n'a été détecté. Quatorze souches ont été isolées dans les conditions d'aérobiose. Ces isolats ont présenté une diversité morphologique, physiologique, biochimique et métabolique importante. Egalement, elles ont présenté des activités enzymatiques très intéressantes: amylases, protéases, chitinase, cellulase, lipase, lécithinases, lipoprotéinase Intéressantes.

**Mots clés:** Hammam Essalihine, bactéries thermophiles, criblage enzymatique, enzymes thermostables.

## Abstract

In Algeria, there are more than 280 hot springs spread across the country, this number increases as we move towards the North-East. These systems provide a favorable environment for conducting research on new thermophilic strains. Indeed, the latter are capable of producing interesting biomolecules, in particular enzymes. Consequently, these hot springs are privileged places of investigation in the quest for scientific discovery. Our work focused on the physico-chemical characterization and the evaluation of the sanitary quality of the thermal waters of Assif El Hammam in the daïra of Adekar, Wilaya of Béjaïa and the search for bacteria of biotechnological interest. The physico-chemical analysis revealed a diverse mineral composition, no pathogenic germ was detected. 14 strains were isolated under aerobic conditions. These isolates showed significant morphological, physiological, biochemical and metabolic diversity. Also, they presented enzymatic activities very interesting: amylases, protéases, chitinase, cellulase, lipase, lécithinases, lipoprotéinase.

**Key words:** Assif El Hammam, thermophilic bacteria, enzymatic screening, thermostable enzymes.

## الملخص

يوجد في الجزائر أكثر من 280 ينبوعًا حارًا منتشرة في جميع أنحاء البلاد، ويزداد هذا العدد كلما اتجهنا نحو الشمال الشرقي. توفر هذه النظم البيئية بيئة ملائمة لإجراء البحوث على سلالات جديدة محبة للحرارة. في الواقع، هذه الأخيرة قادرة على إنتاج جزيئات حيوية مثيرة للاهتمام، وخاصة الإنزيمات. ركز عملنا على التوصيف الفيزيائي والكيميائي وتقييم الجودة الصحية للمياه الحرارية اسيف الحمام في دائرة أدكار (ولاية بجاية)، وأبحاث البكتيريا ذات الأهمية التكنولوجية الحيوية. كشف التحليل الفيزيائي الكيميائي عن تركيبة معدنية متنوعة، ولم يتم اكتشاف أي جراثيم ممرضة. تم عزل أربعة عشر سلالة تحت الظروف الهوائية. أظهرت هذه العزلات تنوعًا مورفولوجيًا وفسولوجيًا وكيميائيًا حيويًا واستقلابيًا كبيرًا. كما قدموا أنشطة إنزيمية مثيرة جدًا للاهتمام: الأميليز، والبروتياز، والكيتيناز، والسيلولاز، والليباز، والليسيثيناز، والبروتين الدهني المثير للاهتمام

**الكلمات الدالة:** حمام الصالحين، البكتيريا المحبة للحرارة، الفحص الأنزيمي، الإنزيمات الحرارية