

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

Université Mouloud Mammeri, Tizi -Ouzou  
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 Biotechnologie

Option: Biotechnologie Microbienne

Thème

*Analyse physico- chimique et microbiologique des eaux d'une source thermique algérienne: Études des propriétés enzymatiques*

Réalisé par: DJELOUAH Nadia  
OUHOCINE Djedjiga

Soutenu le 11 / 07 / 2022 devant le jury composé de :

M<sup>me</sup> BERROUANE N.  
M<sup>r</sup> BOUACEM K.  
M<sup>me</sup> BOUDAOU S.

MAB-UMMTO  
MCA-UMMTO  
MAB-UMMTO

Présidente  
Promoteur  
Examinatrice

Année universitaire 2021/2022

## **Remerciements**

*Tous 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.*

*Nous tenons à remercier monsieur Bouacem K., pour la qualité du suivie, l'encadrement, sa patience, sa disponibilité et le temps qu'il nous a consacré et surtout ses judicieux conseils.*

*Nous remercions l'ensemble de l'équipe pédagogique, qui nous a suivie durant ces cinq années et nous a transmis toutes les connaissances nécessaires à notre apprentissage.*

*Nous tenons aussi à remercier les membres du jury pour avoir bien voulu nous accorder leur temps précieux pour examiner ce travail.*

*Enfin, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

**Merci**

# *Dédicaces*

*Au nom de Dieu le tout- puissant*

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

*À ma très chère **maman**. Tu es la meilleure mère et amie que je puisse espérer avoir; ma reconnaissance et mon respect sont infini. Je t'aime plus que tout.*

*À mon très **cher père**.*

*À ma **grand- mère** que j'aime tant.*

*À mes très chères **sœurs**.*

*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.*

*DJELLOUAH Nadia*

# *Dédicaces*

*Au nom de Dieu le tout- puissant*

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

*À celle qui a nourrit en moi l'amour du savoir et qui a cru en moi. Je te dédie ce modeste travail en guise de gratitude et de reconnaissance, ta présence à mes côtés m'a souvent été une source de force et de courage.*

*A toi ma très chère **MAMAN**.*

*A la mémoire de mon défunt Père*

*Qui nous a quitté trop tôt, et qui serait très honoré de voir ses rêves se concrétiser, son souhait aboutir.*

*Repose en paix cher **PAPA**.*

*À ma très chers sœur **Lynda**, qui m'a beaucoup encouragée à aller de l'avant, je te dis aujourd'hui grand merci sœurlette.*

*À Mes très chers frères **Yacine, Saïd et Belaid**.*

*A mes collègues **Malika, Soraya et Sonia**.*

*A mon adorable binôme **Nadia**.*

*À toutes ma famille et mes amis*

*A tous mes collègues de **l'UMMTO**.*

*À tous ceux qui ont cru en moi et m'ont soutenue.*

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

*À vous cher lecteur.*

**OUHOCINE Djedjiga**

<b>Remerciements</b>	
<b>Dédicaces</b>	
<b>Table des matières</b>	
<b>Liste des figures et tableaux</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Synthèse bibliographique</b>	
<b>I. Ecosystèmes chauds.....</b>	<b>3</b>
<b>II. Sources thermales.....</b>	<b>3</b>
<b>II.1. Sources thermales océaniques.....</b>	<b>3</b>
<b>II.2. Sources thermales terrestres.....</b>	<b>3</b>
<b>III. Description de quelques sources hydrothermales.....</b>	<b>4</b>
<b>III.1. Dans le monde.....</b>	<b>4</b>
III.1.1. Au Costa Rica.....	5
III.1.2. Colombie.....	5
III.1.3. Arménie.....	5
III.1.4. Tunisie.....	5
<b>III.2. En Algérie.....</b>	<b>5</b>
III.2.1. Hammam Righa.....	7
III.2.2. Hammam El Meskoutine.....	7
<b>IV. Autres écosystèmes chauds.....</b>	<b>8</b>
<b>IV.1. Geysers.....</b>	<b>8</b>
<b>IV.2. Fumeurs noirs ou les événements hydrothermaux en haute mer.....</b>	<b>9</b>
<b>IV.3. Fumerolles.....</b>	<b>9</b>
<b>IV.4. Solfatares.....</b>	<b>10</b>
<b>IV.5. Mares de boues (Mudpots).....</b>	<b>10</b>
<b>IV.6. Lacs de cratères.....</b>	<b>11</b>
<b>V. Biodiversité microbienne dans les sources thermales.....</b>	<b>11</b>
<b>V.1. Bactéries thermophiles.....</b>	<b>12</b>
<b>V.2. Espèces du groupe <i>Bacillus</i> les plus isolées à partir d'écosystèmes chauds.....</b>	<b>12</b>
V.2.1. <i>Anoxybacillus</i> .....	12
V.2.2. <i>Geobacillus</i> .....	13
V.2.3. <i>Brevibacillus</i> .....	13
V.2.4. <i>Thermus aquaticus</i> .....	13

<b>V.3. Archées .....</b>	<b>14</b>
V.3.1. Phylum des <i>Crenarchaeota</i> .....	14
V.3.2. Phylum des <i>Euryarchaeota</i> .....	14
V.3.3. Phylum des <i>Nanoarchaeota</i> .....	15
<b>VI. Mécanismes d'adaptation chez les thermopiles .....</b>	<b>15</b>
<b>VI.1. Protéines.....</b>	<b>16</b>
<b>VI.2. Acides nucléiques .....</b>	<b>16</b>
<b>VI.3. Membrane cytoplasmique.....</b>	<b>16</b>
<b>VII. Enzymes.....</b>	<b>17</b>
<b>VII.1. Définition d'enzymes .....</b>	<b>17</b>
<b>VII.2. Classes d'enzymes .....</b>	<b>17</b>
<b>VII.3. Enzymes thermostables .....</b>	<b>18</b>
VII.3.1. Protéases.....	18
VII.3.2. Chitinases .....	18
VII.3.3. Cellulases.....	19
VII.3.4. Lipases.....	19
VII.3.5. Xylanases.....	20
VII.3.6. Amylases .....	20
VII.3.7. Kératinases .....	21
VII.3.8. Estérases .....	21
<b>VII.4. Applications des enzymes thermostables.....</b>	<b>22</b>
VII.4.1. Biologie moléculaire: Taq polymérase.....	22
VII.4.2. Nucléases thermostables.....	22
VII.4.3. Production de biocarburants .....	23
VII.4.4. Industrie du cuir.....	24
VII.4.5. Industrie alimentaire .....	24
VII.4.6. Industrie pharmaceutique .....	24
VII.4.7. Industrie textile.....	24
VII.4.8. Industrie papetière .....	24
VII.4.9. Industrie des détergents.....	25
<b>VIII. Exopolysaccharides .....</b>	<b>26</b>
<b>Matériel et Méthodes</b>	
<b>I. Site d'étude .....</b>	<b>28</b>
<b>I.1. Échantillonnage.....</b>	<b>28</b>
<b>II. Matériel .....</b>	<b>29</b>

<b>II.1. Matériel biologique .....</b>	<b>29</b>
<b>II.2. Matériel non biologique .....</b>	<b>29</b>
<b>III. Méthodes.....</b>	<b>29</b>
<b>III.1. Analyse physico-chimique.....</b>	<b>29</b>
III.1.1. Appréciation de la qualité organoleptique .....	29
III.1.2. Paramètres physico-chimiques.....	29
III.1.2.1. Mesure de la température et du potentiel d'hydrogène.....	29
III.1.2.2. Mesure de la turbidité.....	29
III.1.2.3. Taux d'oxygène dissout .....	29
III.1.2.4. Résidu sec.....	30
III.1.2.5. Conductivité .....	30
III.1.3. Détermination de l'alcalinité.....	30
III.1.3.1. Titre alcalimétrique et titre alcalimétrique complet .....	30
III.1.4. Détermination de la dureté.....	31
III.1.4.1. Détermination de la dureté calcique .....	31
III.1.5. Recherche des ions et des métaux lourds.....	32
<b>III.2. Microbiologie des eaux .....</b>	<b>32</b>
III.2.1. Étude de la qualité sanitaire des eaux .....	32
III.2.2. Recherche et isolement .....	34
III.2.3. Caractérisation des bactéries thermophiles .....	34
III.2.3.1. Étude morphologique .....	34
III.2.3.1.1. Observation macroscopique .....	34
III.2.3.1.2. Observation microscopique .....	34
III.2.3.1.2.1. Observation à l'état frais.....	34
III.2.3.1.2.2. Observation à l'état fixé (coloration de Gram).....	34
III.2.3.2. Étude des caractères physiologiques .....	35
III.2.3.2.1. Influence de la température .....	35
III.2.3.2.2. Influence de la salinité.....	35
III.2.3.2.3. Influence du pH.....	35
III.2.3.3. Étude biochimique.....	35
III.2.3.3.1. Étude du métabolisme énergétique.....	35
A. Test de catalase .....	35
B. Test d'oxydase.....	35
C. Test Nitrate réductase.....	35
III.2.3.3.2. Mise en évidence du métabolisme protéique .....	36
A. Hydrolyse de la gélatine.....	36

B. Production d'indole.....	36
III.2.3.3.3. Étude du métabolisme glucidique .....	36
A. Test du milieu Triple Sugar Iron.....	36
B. Test mannitol mobilité .....	36
III.2.3.3.4. Étude du métabolisme des acides organiques .....	37
III.2.3.3.4.1. Test de citrate.....	37
III.2.3.3.5. Recherche du type respiratoire .....	37
III.2.3.3.6. Dégradation de l'urée .....	37
III.2.3.3.7. Test Ortho-Nitro-Phenyl Galactopyranoside.....	37
III.2.3.4. Mise en évidence de l'activité hydrolytiques extracellulaires .....	37
III.2.3.4.1. Caséinases.....	37
III.2.3.4.2. Chitinases .....	38
III.2.3.4.3. Activité lipolytique .....	38
III.2.3.4.3.1. Estérases.....	38
III.2.3.4.3.2. Lipases .....	38
III.2.3.4.4. Cellulases.....	38
III.2.3.4.5. Lécithinases .....	38
III.2.3.4.6. Amylases .....	39
<b>Résultats et Discussion</b>	
<b>I. Résultats de l'analyse physicochimique.....</b>	<b>40</b>
<b>I.1. Appréciation de la qualité organoleptique de l'eau .....</b>	<b>40</b>
<b>I.2. Résultats des paramètres physico-chimiques .....</b>	<b>40</b>
<b>I.3. Résultats de l'alcalinité de l'eau .....</b>	<b>41</b>
I.3.1. Titre alcalimétrique .....	41
I.3.2. Titre alcalimétrique complet .....	41
<b>I.4. Résultats de la détermination de la dureté calcique .....</b>	<b>41</b>
I.4.1. Résultats de la détermination de la dureté du $Mg^{2+}$ .....	42
I.4.2. Résultats de la détermination de la dureté totale .....	42
<b>I.5. Résultat de la recherche des ions et des métaux lourds .....</b>	<b>42</b>
<b>II. Résultats de la microbiologie des eaux .....</b>	<b>43</b>
<b>II.1. Résultats de l'analyse de la qualité sanitaire .....</b>	<b>43</b>
<b>II.2. Etude morphologique.....</b>	<b>43</b>
II.2.1. Examen macroscopique.....	43
II.2.2. Examen microscopique .....	44
<b>II.3. Caractérisation physiologique des souches .....</b>	<b>46</b>
II.3.1. Influence de la température sur la croissance .....	46

II.3.2. Influence de la salinité sur la croissance .....	47
II.3.3. Influence du pH sur la croissance .....	47
<b>II.4. Résultat de l'étude biochimique des souches isolées .....</b>	<b>47</b>
II.4.1. Métabolisme énergétique .....	48
II.4.2. Métabolisme protéique .....	48
II.4.2.1. Hydrolyse de la gélatine .....	48
II.4.2.2. Production d'indole .....	48
II.4.3. Métabolisme glucidique .....	48
II.4.3.1. TSI agar .....	48
II.4.3.2. Test Mannitol-Mobilité .....	48
II.4.4. Métabolisme des acides organiques .....	48
II.4.4.1. Test de citrate .....	48
II.4.5. Recherche du type respiratoire .....	48
II.4.6. Dégradation de l'urée .....	49
II.4.7. Test Ortho-Nitro-Phenyl Galactopyranoside .....	49
<b>II.5. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires .....</b>	<b>51</b>
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>54</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>55</b>
<b>Annexes</b>	
<b>Résumé</b>	
<b>Abstrat</b>	

### Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Exemples de sources thermales dans le monde. (A). Geysier Pohutu (Nouvelle-Zélande), (B). Parc national de Yellowstone (Etats Unis), (C).Vadmalher (Islande), (D). Uzon Caldera (Russie). .....	4
<b>Figure 2:</b> Carte des principales sources géothermiques du nord Algérien. ....	6
<b>Figure 3:</b> Hammam Debagh Guelma (Algérie). ....	8
<b>Figure 4:</b> Dépôts de silice autour des geysers du groupe Lion et Doublet Pool. Parc national de Yellowstone, Wyoming, États-Unis. ....	8
<b>Figure 5:</b> Fumeurs noirs .....	9
<b>Figure 6:</b> (A). Fumerolles dans le cratère de Vulcano (Italie), (B). Événements à vapeur Hawaïens .....	10
<b>Figure 7:</b> Mudpot dans le parc national de Yellowstone. ....	10
<b>Figure 8:</b> Lac de cratère Inferno (Nouvelle-Zélande). ....	11
<b>Figure 9:</b> Localisation de la station thermale Hammam Essalihine. ....	28
<b>Figure 10:</b> Site du prélèvement au niveau de la source thermale Hammam Essalihine. ....	28
<b>Figure 11:</b> Aspect macroscopique des colonies isolées sur GN au GX 20. ....	44
<b>Figure 12:</b> Observation du Gram au GX1000. ....	45
<b>Figure 13:</b> Activité amylolytique de certaines souches isolées. ....	51
<b>Figure 14:</b> Activité de la caséinase sur les protéines du lait après 48 h. ....	51
<b>Figure 15:</b> Zone claire autour de la colonie dotée d'une cellulase. ....	52
<b>Figure 16:</b> Dépôt de $\text{CaCl}_2$ autour des colonies dotées d'une estérase au Tween 20 et Tween80. ....	52
<b>Figure 17:</b> Mise en évidence des enzymes sur milieu à émulsion de jaune d'œuf. (A). Lipase, (B). Lécithinase, (C). Lipoprotéinase. ....	53
<b>Figure 18:</b> Étude quantitative de la capacité de chaque souche isolée à produire des enzymes. ....	55
<b>Figure 19:</b> Étude du type d'enzyme sécrétée par les isolats. ....	55

### Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Localisations et températures de quelques sources thermales algériennes. ....	7
<b>Tableau II:</b> Principales classes d'enzymes dans le système CE. ....	17
<b>Tableau III:</b> Enzymes thermostables et leurs applications. ....	25
<b>Tableau IV:</b> Enzymes thermostables avec leur température optimale. ....	26
<b>Tableau V:</b> Germe recherchés (conditions opératoires). ....	33
<b>Tableau VI:</b> Milieux utilisés pour les isollements et leurs compositions .....	34
<b>Tableau VII:</b> Résultats de la mesure de la T, pH, turbidité, l'oxygène dissout, conductivité et résidus sec de l'eau thermale Hammam Essalihine .....	40
<b>Tableau VIII:</b> Résultat du titre alcalimétrique .....	41
<b>Tableau IX:</b> Résultat du titre alcalimétrique complet. ....	41
<b>Tableau X:</b> Résultat de la dureté calcique. ....	41
<b>Tableau XI:</b> Résultat de la dureté du $\text{Mg}^{2+}$ . ....	42
<b>Tableau XII:</b> Résultat de la dureté totale .....	42

## Liste des figures et tableaux

---

<b>Tableau XIII:</b> Mise en évidence de la présence ou absence de certains ions dans la source thermale étudiée. ....	42
<b>Tableau XIV:</b> Résultats du contrôle de la qualité sanitaire. ....	43
<b>Tableau XV:</b> Caractères macroscopiques observés chez les souches isolées. ....	44
<b>Tableau XVI:</b> Résultats de l'ensemble des caractéristiques morphologiques observées à l'état frais et fixé. ....	45
<b>Tableau XVII:</b> Résultats de l'influence de la température, la salinité et le pH sur la croissance .....	47
<b>Tableau XVIII:</b> Résultats de la galerie biochimique des souches recherchées. ....	50
<b>Tableau XIX:</b> Résultats des activités enzymatiques recherchées .....	54

**A:** Aérobie.  
**AAF:** Aéro-anaérobie facultatif.  
**Al:** Aluminium.  
**AS:** Aérobie stricte.  
**Cat:** Catalase.  
**Cas9:** CRISPR associated protein 9.  
**Cd:** Cadmium.  
**Cit P:** Citrate perméase.  
**Cr:** Chrome.  
**CRISPR:** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats.  
**Cu:** Cuivre.  
**°F:** Degré français.  
**Fe:** Fer.  
**Gél:** Gélatine.  
**Glu:** Glucose.  
**Ind:** Indole.  
**K:** Potassium.  
**Lac:** Lactose.  
**Manit:** Mannitol.  
**Mg:** Magnésium.  
**Mn:** Manganèse.  
**Mob:** Mobilité.  
**Na:** Sodium.  
**NaCl:** Chlorure de sodium.  
**NH<sub>4</sub>:** Ammonium.  
**Ni:** Nickel.  
**NR:** Nitrate réductase.  
**ONPG:** O-Nitro phényl-bêta-D-galactopyranoside .  
**Oxy:** Oxydase.  
**pH:** Potentiel hydrogène.  
**RM:** Rouge de Méthyle.  
**Sacch:** Saccharose.  
**T:** Température.  
**VP:** Test de Voges Proskauer  
**Zn:** Zinc.

# *Introduction*

Des sites d'activité volcanique peuvent être trouvés partout dans le monde et même sous la mer. Les régions volcaniques offrent une variété d'environnements pour les microorganismes archéens et bactériens extrêmophiles. Les exemples les plus connus de ces environnements extrêmes sont les sources chaudes de surfaces terrestres.

Les extrêmophiles habitant les sources chaudes sont considérés 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. Les thermophiles sont particulièrement importants en biotechnologie. Ils ont développé des adaptations uniques aux températures élevées et représentent des bioressources importantes pour les enzymes et processus thermostables.

Au cours des deux dernières décennies, Les sources chaudes sont devenues des sujets de recherches irremplaçables et attractifs. Les chercheurs se sont de plus en plus concentrés sur la riche 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 thermotolérants 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 et économiquement réalisable.

Dans le cadre de l'étude d'enzymes thermostables présentant un intérêt industriel, nous nous concentrons dans ce modeste travail sur l'étude physico-chimique, l'isolement et la caractérisation préliminaire des bactéries thermophiles de la source chaude Hammam Essaline à Assif El Hammam dans la Wilaya de Bejaia, puis procéder au criblage de leurs activités enzymatiques extracellulaires.

À travers cette étude, nous allons essayer de répondre à la problématique suivante; notre source d'intérêt renferme-t-elle des souches bactériennes potentielles aptes à produire des enzymes d'intérêt biotechnologique ?

Pour ce faire, nous allons procéder à l'opérationnalisation du problème. Et vérifier si:

- Cette source est riche et diversifiée en terme de population microbienne.
- Les isolats issus de cette source sont dotés de forte activités enzymatiques.

Ce manuscrit comporte trois grandes parties: partie théorique qui est une synthèse bibliographique basée sur quelques rappels de notions de bases et définitions concernant les microorganismes thermophiles, leur biodiversité, leurs niches écologiques, leurs modes d'adaptations, les substances bioactives et leurs applications biotechnologiques. Partie pratique

comportant la description du matériel et les méthodes d'analyses utilisées. Partie résultats et discussions, contenant les résultats obtenus et leur interprétation, et enfin une conclusion et des perspectives d'avenir.

*Synthèse  
bibliographique*

### I. Ecosystèmes chauds

On rencontre, à travers le monde entier, des biotopes naturels, où l'apparition des microorganismes thermophiles est possible. Ce sont des habitats à température relativement élevée, qui peuvent être d'origine terrestre ou marine comme les zones géothermiques volcaniques terrestres et les événements hydrothermaux sous-marins. Les zones géothermiques et volcaniques comprennent les fumerolles terrestres ou les solfatares, les geysers et les sources chaudes terrestres, ces écosystèmes sont les plus connus pour abriter une variété considérable de microorganismes thermophiles (Satyanarayana et *al.*, 2013).

### II. Sources thermales

#### II.1. Sources thermales océaniques

Ce sont des sources d'eau profondes très chaudes, allant jusqu'à 350-400°C. Elles se forment au fond des océans sur les zones tectoniques actives, notamment, au niveau des dorsales. C'est une émission qui résulte de la pénétration de l'eau de mer par des fissures du plancher océanique, en s'enfonçant l'eau se réchauffe et sa densité diminue en provoquant sa remontée à la surface (Gargaud, 2005).

#### II.2. Sources thermales terrestres

Elles sont des sources d'eau chaudes chauffées en général par un système volcanique ou l'eau chaude géothermique sort du sol: événements marins, solfatares, geysers (Gargaud, 2005). Elles se situent dans des zones tectoniques actives, caractérisées par une couche mince de la coquille la plus externe de la terre. Des microorganismes avec des propriétés inhabituelles de résistance à des conditions environnementales extrêmes, se développent dans ces endroits (Saghatelyan et *al.*, 2021). Ces environnements varient en fonction des caractéristiques géologiques et des propriétés physico-chimiques, notamment, les gradients de température (Pandey et *al.*, 2015), et de pH (Hussein et *al.*, 2017). La température dans ces sites est généralement supérieure à 60°C, limite de la vie eucaryote (Pandey et *al.*, 2015), mais une source naturelle peut être déclarée comme étant thermale si la température de son eau est supérieure à la température moyenne locale de 8,3°C (Liao, 2018). Elles ont été reconnues comme des milieux naturels propices à la colonisation des thermophiles et sont généralement riches en archéobactéries et en bactéries chimio-autotrophes hyperthermophiles (Gargaud, 2005). En plus d'être un habitat très solide pour des microorganismes dotés d'enzymes d'intérêt pour la médecine, l'agriculture et dans l'industrie. Ces sources sont aussi utilisées dans le thermalisme, l'aquaculture, le chauffage de serres, la climatisation et dans la production d'électricité (Suleiman et *al.*, 2020; Benziada, 2022).

## III. Description de quelques sources hydrothermales

### III.1. Dans le monde

Les sources géothermiques existent dans tous les continents du globe, en Eurasie, en Amérique du Nord et du Sud, en Afrique, Australie, Océanie, et dans l'Antarctique. Mais sont concentrées dans certaines régions plus que d'autres (Hussein *et al.*, 2017). Elles renferment un nombre important de microorganismes d'intérêt biotechnologique. Ces écosystèmes ont été classés selon leurs températures, en sources à basse température, avec des températures inférieures à 55°C et en sources à hautes températures avec des températures dépassant les 55°C. Selon le pH, elles se divisent en sources acides avec un  $\text{pH} < 4$ , d'acidités intermédiaires à  $\text{pH} \sim 4$ , neutres avec un  $\text{pH} \sim 7$  et alcalines où le  $\text{pH} > 7$ . Enfin, selon leur origine, en sources naissantes des eaux magmatiques des zones volcaniques et des eaux telluriques, qui se forment lorsque les courants d'eaux souterrains passent le long des roches chaudes profondes (Castelán-Sánchez *et al.*, 2020). Les sources thermales 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 biodiversité dans ces sources diminue généralement avec l'augmentation de la température et la baisse du pH (Castelán-Sánchez *et al.*, 2020).

La figure 1 illustre quelques sources thermales les plus connues et les plus étudiées dans le monde



**Figure 1:** Exemples de sources thermales dans le monde. (A). Geyser Pohutu (Nouvelle-Zélande) [1], (B). Parc national de Yellowstone (Etats Unis) [2], (C).Vadmalher (Islande) [3], (D). Uzon Caldera (Russie) [4].

### III.1.1. Au Costa Rica

De nombreuses sources thermales jaillissent des flancs nord des volcans Irazú et Turrialba, au Costa Rica, à une altitude comprise entre 1880 et 2430. D'ouest en est, elles sont réparties en quatre groupes : «San Cayetano», «Ojo de Agua», «Santa Teresita» et «Bajo Las Peñas». Les sources thermales de «San Cayetano» sont situées dans un canyon très végétalisé, à une altitude de 1887 m. Ces sources se mélangent aux eaux de pluie froides. À la sortie, elles se déversent dans une petite structure en forme de grotte. Cascade dans une piscine chaude bleu clair, mesurant 8-15m de largeur, et 1,5m de profondeur (Rouwet et *al.*, 2021). Les sources «Ojo de Agua » sont situées à une altitude de 2410 m. De nombreux petits exutoires déversent des eaux opaques d'un blanc laiteux dans un réseau de petits ruisseaux dans une forêt à végétation dense (Rouwet et *al.*, 2021). Les sources de «Santa-Teresita» se déversent à 3,5 km au nord-est du cratère Irazú, à 2241 m d'altitude. Les eaux de cette source sont boueuses.

### III.1.2. Colombie

Les Andes colombiennes possèdent plusieurs sources chaudes qui représentent des écosystèmes uniques et extrêmes en raison de leur haute altitude et de leur exposition aux rayons ultraviolets (UV). Le «Coquito» est une source située dans le parc naturel national Los Nevados, elle a un pH bas de 2,7 et une température de l'eau d'environ 29°C, qui est considérablement plus élevé que la température ambiante qui est de 9°C ce qui permet de la classer comme source chaude (Jiménez et *al.*, 2012).

### III.1.3. Arménie

L'Arménie renferme de nombreuses sources thermales. D'après Saghatelyan et *al.* (2021), neuf sources géothermiques minéralisées avec des températures allant de 25,8 à 70°C se situent à des altitudes allant de 960 à 2090 m au-dessus de la mer. La plupart sont des sources modérément chaudes ou méso-thermiques avec des températures allant de 37 à 50°C.

### III.1.4. Tunisie

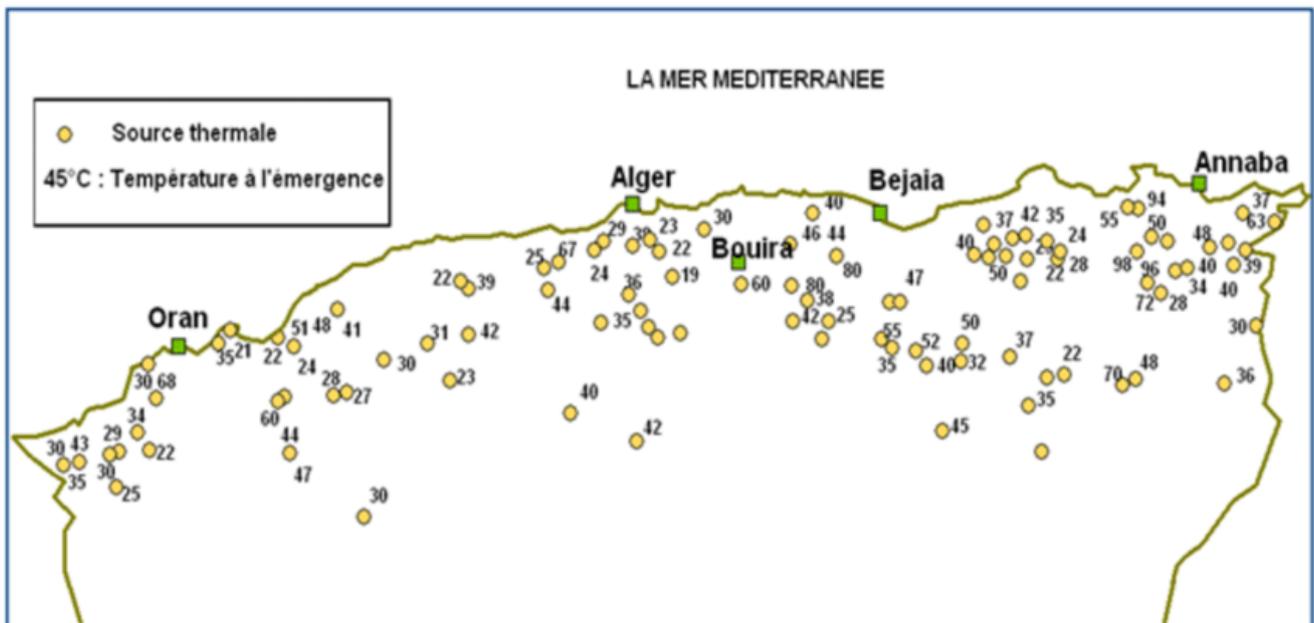
Les sources hydrothermales se situent dans plusieurs régions tunisiennes: Ichkeul, Jebel oust, Zriba, Korbos, Gafsa, Touzeur et Kebelli. Les eaux du nord de la Tunisie ont été caractérisées par des températures élevées de 49 à 64°C et un pH acide avec tendance à la neutralité et d'autres sources chaudes de 42 à 72°C, avec des pH neutres et une tendance à l'alcalinité 7 à 8,1 (Thebti et *al.*, 2016).

### III.2. En Algérie

L'Afrique du Nord montre une grande diversité de niches écologiques extrêmes caractérisées par une importante richesse microbiologique. L'Algérie possède de nombreux biotopes extrêmes tels que les sources chaudes, les lacs salins et les réservoirs pétroliers (Mechri et *al.*, 2021). Elle est considérée comme l'un des pays les plus riches en sources géothermiques

au monde, avec plus de 240 sources thermales, avec des températures allant de 19°C à 98°C (Bouacem et *al.*, 2022). Un tiers de ces sources ont des températures supérieures à 45 °C (Benziada, 2022). Le tableau I donne les températures moyennes de quelques sources thermales algériennes. Les sources chaudes en Algérie sont très abondantes, leur utilisation à des fins thérapeutiques est une tradition ancienne et bien connue (Amarouche-Yala et *al.*, 2015). Malgré les études intensives sur la diversité microbienne des sources chaudes terrestres à travers le monde, les sources hydrothermales algériennes restent très peu étudiées, excepté quelques rares études récentes sur les bactéries thermophiles isolées de certaines sources (Benammar et *al.*, 2020). On peut citer parmi les principales et les plus populaires sources thermales en Algérie: Hammam Melouane (Blida), Hammam Righa (Ain Defla), Hammam Médéa, Hammam Kséna (Bouira) (Benziada, 2022), Hammam EL Bibans (Saïda) et Hammam Debagh (Guelma) (Ait Ouali et *al.*, 2019).

La figue ci-dessous est une carte géographique illustrant la localisation des principales sources thermales du nord algérien.



**Figure 2:** Carte des principales sources géothermiques du nord Algérie [5].

**Tableau I:** Localisations et températures de quelques sources thermales algériennes (Ait Ouali et *al.*, 2019).

Source thermale	Localisation	Température (°C)
<b>Hamмам El Biban</b>	Saïda	80
<b>Hamмам Kiria</b>	Béjaïa	40
<b>Hamмам Ain Mentila</b>	Relizane	32
<b>Hamмам Righa</b>	Ain Defla	67
<b>Hamмам Melouane</b>	Blida	39
<b>Hamмам Silal</b>	Béjaïa	42
<b>Hamмам Kséna</b>	Bouira	61
<b>Hamмам Sidi Yahia Al Aidli</b>	Béjaïa	50
<b>Hamмам Meskhoutine</b>	Guelma	98
<b>Hamмам Boutaleb</b>	Sétif	52

### III.2.1. Hamмам Righa

Hamмам Righa est situé à 100 Km au sud-ouest d'Alger, Algérie (2°24' Est, 36°22' 60" Nord) (Bouacem et *al.*, 2022), dans une région verdoyante et boisée de la wilaya d'Ain Defla, à une altitude de 525 mètres reliée à un hôpital militaire et quelques établissements. L'hôpital est alimenté par neuf sources hyperthermales à une température avoisinant les 54°C (Ouali, 2008).

### III.2.2. Hamмам El Meskhoutine

Hamмам Meskhoutine appelé aussi Hamмам Debagh, est situé au nord-est de l'Algérie, à 110 Km de l'Est de la wilaya de Constantine (Ouali, 2008). Dans une zone semi-aride. La température moyenne annuelle est de 17°C, avec des températures mensuelles moyennes allant de 9°C à 26°C (Boutarfa et *al.*, 2022). C'est un réservoir d'eau douce situé à 23 km de la ville de Guelma (Guellati et *al.*, 2017). Il se trouve à une altitude de 320 mètres (Ouali, 2008). La source de Hamмам-Meskhoutine est la plus florissante de l'Algérie et ses eaux sont les plus chaudes (Ouali, 2008). Au niveau de ce Hamмам les températures peuvent atteindre 98°C, ce qui offre la source terrestre la plus chaude du pays et la deuxième au monde après l'Islande (Benammar et *al.*, 2020; Naimi and Chérif, 2021). Elle comporte neuf sources hyperthermales dont la température de l'eau varie de 90 à 98°C. Les eaux ont une odeur sulfureuse, leur faciès chimique est bicarbonatée calcique, radioactive, avec dégagement d'hydrogène sulfuré (Ouali, 2008), comme le montre la figure 3. Cette source est affectée par une activité tectonique intense. Les eaux thermales et froides se mélangent et se minéralisent par lessivage des roches en profondeur avant de remonter en surface par une faille majeur (Naimi and Chérif, 2021).



**Figure 3:** Hammam Debagh Guelma (Algérie) [6].

### IV. Autres écosystèmes chauds

Les environnements naturels des thermophiles vont des sites volcaniques terrestres comme les champs de solfatares aux systèmes hydrothermaux sous-marins, sédiments, volcans sous-marins, fumerolles et événements avec des températures supérieures à 300°C. Des sites souterrains tels que les réservoirs de pétrole et les sols de surfaces chauffées par le soleil où les températures peuvent aller jusqu'à 65°C. Il existe également des environnements chauds créés par l'homme tels que les tas de composts, généralement autour de 60 -70°C et les tas de scories avoisinant les 100°C, ainsi que les processus industriels et les chauffe-eau (Mehta et *al.*, 2016).

#### IV.1. Geysers

Les geysers sont rares, sont à moins de 1000 dans le monde. Ce sont des sources qui produisent par intermittence des mélanges de vapeur et d'eau liquide (Satyanarayana et *al.*, 2013). Ils peuvent être périodiques ou irréguliers et leur comportement d'éruption peut changer dans le temps (Wang and Manga, 2021). Ils n'existent que dans quelques endroits sur terre. La moitié des geysers se trouvent dans le parc de Yellowstone (Etats-Unis) (Satyanarayana et *al.*, 2013). La figure 4 est un geyser du groupe Lion et Doublet Pool. Parc national de Yellowstone, Wyoming, Etat-Unies, présentant des dépôts de silice.



**Figure 4:** Dépôts de silice autour des geysers du groupe Lion et Doublet Pool. Parc national de Yellowstone, Wyoming, États-Unis (Des Marais and Walter., 2019).

### IV.2. Fumeurs noirs ou les événements hydrothermaux en haute mer

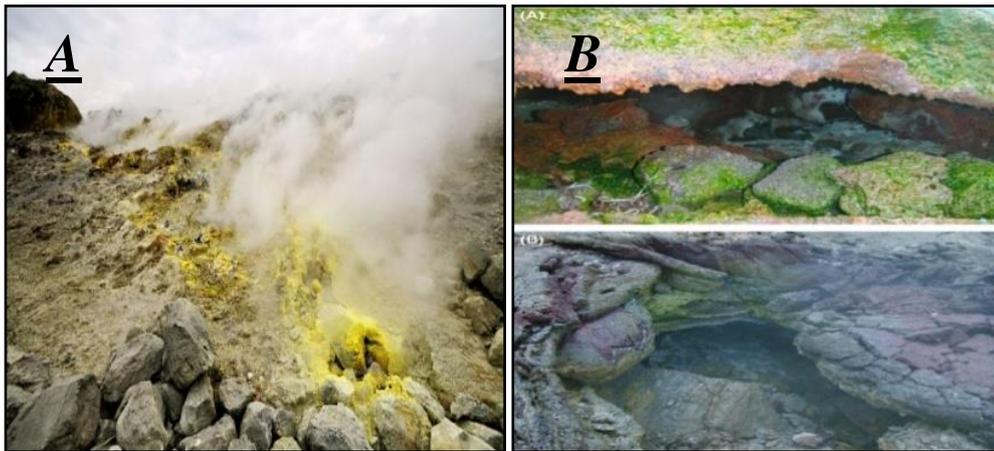
Ils se produisent à des profondeurs de 800 à 3500 m en haute mer. La figure 5 montre des émissions de fluides très chaudes provenant du fumeur noir au fond de la mer. La communauté microbienne de ces événements hydrothermaux est très diversifiée comprenant des bactéries et des archées (Satyanarayana et *al.*, 2013).



**Figure 5:** Fumeurs noirs [7].

### IV.3. Fumerolles

Les fumerolles ou événements à vapeur se forment lorsque l'eau de pluie est chauffée par le magma et s'échappe sous forme de vapeur à travers les dépôts volcaniques. Ces dépôts se forment lorsque les gaz chauds sortants de la croûte terrestre entrent en contact avec les parois et les plafonds plus froids des événements formant ainsi des dépôts minéraux à fortes concentrations en métaux (Wall et *al.*, 2015). Les gaz tels que le dioxyde de carbone, le dioxyde de soufre, l'acide chlorhydrique et le sulfure d'hydrogène sont aussi émis (Satyanarayana et *al.*, 2013). Les températures de la vapeur peuvent aller de 45°C, dans les fumerolles les plus douces, jusqu'à 180°C, dans les plus chaudes. Elles constituent l'habitat microbien le plus abondant des écosystèmes géothermiques terrestres (Wall et *al.*, 2015). La figure 6 (A) montre bien les vapeurs émises par les fumerolles du cratère de Vulcano en Italie à partir des dépôts volcaniques.



**Figure 6:** (A). Fumerolles dans le cratère de Vulcano (Italie) [8], (B). Événements à vapeur Hawaïens (Wall et *al.*, 2015).

#### IV.4. Solfatares

Les solfatares sont des fumerolles qui émettent des gaz soufrés, elles peuvent atteindre des températures allant jusqu'à 100°C. Des microorganismes thermophiles ont été isolés dans des habitats sulfatariques (Satyanarayana et *al.*, 2013).

#### IV.5. Mares de boues (Mudpots)

Les mudpots ou les mares de boue sont des sources chaudes de sulfate acide qui modifient les unités rocheuses superficielles pour former des suspensions de minéraux argileux (Dahlquist, 2017). Ils sont caractérisés par l'émission de gaz, d'eau et de boue semi-liquide avec des flux importants de méthane dans l'atmosphère (Pol et *al.*, 2007). Un microorganisme méthanotrophe extrêmement acidophile, *Methylacidiphilum fumariolicum* SolV a été isolé d'un pot de boue volcanique en Italie (Pol et *al.*, 2014). La figure 7 représente une mare de boue thermique.



**Figure 7:** Mudpot dans le parc national de Yellowstone [9].

### IV.6. Lacs de cratères

Les lacs de cratère sont des dépressions circulaires d'impact ou d'origine volcanique, remplies ou recouvertes d'eau ou d'un autre liquide non magmatique (El Maarry *et al.*, 2014). La figure 8 illustre le lac du cratère Inferno qui est une grande source chaude acide située dans la vallée du rift volcanique de Waimangu, sur l'île du nord de la Nouvelle-Zélande, elle est influencée par la vapeur qui a un cycle thermique dont la température varie régulièrement de 30°C à 80°C. Les archées seraient le taxon microbien dominant aux stades de hautes températures et les bactéries dominent aux stades de basses températures (Ward *et al.*, 2017).



**Figure 8:** Lac de cratère Inferno (Nouvelle-Zélande) [10].

### V. Biodiversité microbienne dans les sources thermales

Les sources chaudes servent de laboratoires naturels pour l'étude de l'effet des paramètres environnementaux sur l'évolution, la diversité et la physiologie microbienne, ainsi que pour tester les hypothèses sur les facteurs et les mécanismes conduisant à cette diversification (Podar *et al.*, 2020). La tectonique des plaques, peut provoquer une structuration biogéographique et entraîner la spéciation et l'évolution des procaryotes en influençant la diversité microbienne de ces sources (Panosyan *et al.*, 2021). Cette diversité est dictée par les caractéristiques physico-chimiques environnementales tel que le pH, potentiel redox, température, concentration en oligoéléments (Jiménez *et al.*, 2012) et les niveaux de sulfure d'hydrogène dissous (Pandey *et al.*, 2015).

Les thermophiles ont été isolés à partir d'une grande variété d'environnements, de la neige fraîchement tombée aux sables du désert du Sahara. Ils se reproduisent dans l'air, le sol des climats tempérés et tropicaux, dans les régions salines et eaux douces froides et chaudes (Mehta *et al.*, 2016). La température est un facteur déterminant de la structure taxonomique et fonctionnelle des bactéries et des archées dans les sources chaudes, plus la température ambiante est élevée, plus la diversité microbienne est faible (Saghatelyan *et al.*, 2021). De nombreuses nouvelles bactéries et archées avec différents types de métabolismes ont été isolées des sources thermales au cours de ces dernières années (Morozova *et al.*, 2019).

Les microorganismes extrêmophiles ont évolué pour se développer dans une diversité d'environnements extrêmes et ils sont repartis en différentes catégories, qui comprennent les thermophiles, les alcalinophiles, les acidophiles, les halophiles et les psychrophiles (Verma *et al.*, 2021). D'après Jiménez *et al.* (2012), l'analyse de la communauté microbienne de la source chaude le Coquito a montré qu'elle est dominée par des bactéries plutôt que par des archées,

avec prédominance de protéobactéries, firmicutes et planctomycètes. Les genres *Bacillus* et *Thermus* sont les thermophiles aérobies les plus dominants en milieu hydrothermal (Gargaud et al., 2005).

Les sources chaudes acides aux températures modérées varient de 30 à 35°C, elles sont dominées par *Acidiphilium* hétérotrophes mésophiles (Jiménez et al., 2012). Dans ces sources chaudes et acides, les genres les plus représentatifs décrits sont *Acidithiobacillus*, *Acidimicrobium*, *Sulfobacillus*, *Thiomonas*, *Leptospirillum* et *Hydrogenobaculum*. Les bacilles isolés par Saghatelian et al. (2021) dans leur étude, appartiennent principalement aux genres: *Aeribacillus*, *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Parageobacillus*, *Paenibacillus* et *Ureibacillus*. Le genre *Bacillus*, *Geobacillus*, *Parageobacillus* et *Anoxybacillus* étaient les plus abondants.

### V.1. Bactéries thermophiles

Elles sont un groupe de microorganismes adaptés à se développer à des températures élevées. Elles sont réparties en fonction de leur température de croissance optimale, en thermophiles modérés de 50 à 60°C, thermophiles extrêmes allant de 60 à 80°C et hyperthermophiles avec des températures supérieures à 80°C (In Benammar et al., 2020). Les thermophiles sont des procaryotes (bactéries) et des archées ainsi que certains eucaryotes capables de croître jusqu'à 60°C (Kumar et al., 2021). Les microorganismes thermophiles colonisent divers environnements, tels que les cheminées hydrothermales, les sources chaudes terrestres et d'autres sites extrêmes, y compris les régions volcaniques, des failles tectoniquement actives et des résidus de traitement de déchets, comme des tas de composts et des décharges organiques profondes (Mehta et al., 2016). Grâce à leur croissance à des températures élevées et des propriétés macromoléculaires uniques, les thermophiles possèdent un métabolisme puissant et des enzymes physiquement et chimiquement stables. Leur croissance est faible avec des rendements de produits finaux plus élevés comparativement aux espèces mésophiles similaires (Mehta et al., 2016).

### V.2. Espèces du groupe *Bacillus* les plus isolées à partir d'écosystèmes chauds

#### V.2.1. *Anoxybacillus*

Le genre *Anoxybacillus* appartient au phylum des *Firmicutes*, à la classe de *Bacilli*, à l'ordre de *Bacillales* et la famille des *Bacillaceae* (Belduz et al., 2015). Ils sont des bacilles Gram-positifs formant des spores de taille variante de 0.4 à 0.85 sur 2.5 à 5.0 µm, sont des anaérobies aérotolestants ou des anaérobies facultatifs. Les réactions de l'oxydase et de la catalase sont variables (Deep et al., 2013).

Les espèces appartenant au genre *Anoxybacillus* partagent des caractéristiques communes, comme la forme en bâtonnet des cellules végétatives et la position terminale ou subterminale de l'endospore. *Anoxybacillus* est le plus fréquemment isolé des habitats terrestres à haute température (Panosyan et al., 2021). La plupart des *Anoxybacillus* sp vivent dans des sources chaudes mais ils ont été également isolés du fumier d'animaux, des produits laitiers, des produits carnés contaminés, des intestins de poissons et des plantes (Belduz et al., 2015).

Le nom donné à ce genre indique que les espèces qui lui sont attribuées poussent dans des conditions anoxiques, les premières espèces classées dans ce genre étaient des anaérobies aérotolérantes (Filippidou et al., 2016). L'espèce type du genre *Anoxybacillus*, est *Anoxybacillus pushchinoensis*, a été décrite pour la première fois par Pikuta (Deep et al., 2013). Malgré le nom donné au genre, qui suggère qu'il s'agit de microbes qui se développent dans des conditions anoxiques, de nombreux *Anoxybacillus* aérobies et aérotolérants ou anaérobies facultatifs ont été isolés et décrits (Panosyan et al., 2021). Il a été rapporté que les enzymes d'*Anoxybacillus* spp peuvent dégrader divers substrats tels que l'amidon, la cellulose, les graisses et les protéines (Belduz et al., 2015).

### V.2.2. *Geobacillus*

Les bactéries du genre *Geobacillus* sont obligatoirement thermophiles. Elles sont des anaérobies facultatives formant des endospores à Gram positif avec une capacité de production de bioénergie et d'enzymes unique (Reeve et al., 2016). Elles sont principalement distribuées dans des environnements à haute température tels que les sources chaudes, les événements volcaniques et les champs pétroliers (Reeve et al., 2016; Lin et al., 2019). Les membres de ce genre présentent une croissance sur une large plage de températures de 40 à 70°C avec une croissance optimale à 55 et à 65°C (Reeve et al., 2016). Le genre *Geobacillus* est décrit pour la première fois en 2001 (Filippidou et al., 2016).

### V.2.3. *Brevibacillus*

Les bactéries du genre *Brevibacillus* appartiennent à la classe des *Bacilli* et à la famille des *Paenibacillaceae*. C'est un genre bactérien qui colonise divers environnements, tels que le tractus intestinal des animaux, l'eau de mer, le sol, les eaux usées et les sources chaudes (Khalil et al., 2018; Kim et al., 2021). Le genre *Brevibacillus* regroupe des bactéries à Gram positif, aérobies stricts, mobiles, ayant la capacité de sporuler et se présente sous forme de bâtonnets (Schultz et al., 2019). La majorité des espèces de *Brevibacillus* poussent en aérobiose sur des milieux de routine tels que les géloses nutritives et produisent des colonies plates, lisses, grises et jaunâtres. *Brevibacillus* sp LEMMJ03 a été isolée d'un sédiment chaud de 50°C près d'un événement de fumerolles dans la baie Whalers en «île de la déception», en Antarctique (Schultz et al., 2019).

### V.2.4. *Thermus aquaticus*

*Thermus aquaticus* est une bactérie thermophile en forme de bâtonnet, Gram négatif, aérobie (wang et al., 2021). Capable de se développer aussi en anaérobiose, immobile, non pathogène, puise son carbone à partir d'acides aminés et protéines, chimioorganotrophe se développe bien entre 50°C et 80°C avec un optimum de 70°C. Ce thermophile occupe une place particulière dans l'histoire de la microbiologie, Il a été isolé et cultivé pour la première fois en 1969, à partir d'une source chaude dans le parc national de Yellowstone dans le Lower Geyser Basin du parc (Brumm et al., 2015). *Thermus aquaticus* se caractérise par une morphologie cellulaire inhabituelle, il s'agit de "corps ronds", qui semblent être une association de plusieurs

cellules reliées par une enveloppe externe combinée, observée par microscopie électronique et on sait peu de choses sur la fonction de ces formes (Brumm et *al.*, 2015).

### V.3. Archées

Les archées colonisent une variété d'écosystèmes thermiques naturels très diversifiés, allant des événements hydrothermaux en haute mer aux sources chaudes terrestres peu profondes (Straud et *al.*, 2018). Il existe trois phylums chez les archées thermophiles et hyperthermophiles : le phylum *Crenarchaeota*, le phylum *Euryarchaeota* et le phylum *Nanoarchaeota* (Grégoire et *al.*, 2009; Dombrowski et *al.*, 2019).

#### V.3.1. Phylum des *Crenarchaeota*

Les sources naturelles acides à haute température contiennent plusieurs populations d'archées du phylum *Crenarchaeota*, des archées appartenant aux ordres : *Desulfurococcales*, *Thermoproteales* et *Sulfolobales* (Jay et *al.*, 2014). Les *Sulfolobales* prospèrent dans les biotopes extrêmes, tels que les sources chaudes acides et les solfatares volcaniques. En 1972, Thomas Brock a isolé un thermoacidophile, *Sulfolobus acidocaldarius*, à partir d'une source thermale de soufre dans le parc national de Yellowstone. Le biotope naturel de ce microbe, était un environnement acide extrêmement chaud avec un pH de 2,4 et une température de 83°C (Lewis et *al.*, 2021). Les archées appartenant à l'ordre des *Desulfurococcales* sont des membres abondants dans les habitats à haute température du parc national de Yellowstone (Jay et *al.*, 2014). Wemheuer et *al.* (2013) ont identifié une carboxylestérase extrêmement stable à partir de la souche *Pyrobaculum calidifontis* VA1, une archée hyperthermophile, ainsi qu'une nouvelle enzyme lipolytique thermostable chez *Sulfolobus acidocaldarius* DSM 639.

#### V.3.2. Phylum des *Euryarchaeota*

Les *Euryarchaeota* comprennent à la fois des ordres méthanogènes et non méthanogènes. Tous les méthanogènes appartiennent au phylum *Euryarchaeota*. Ils comprennent des membres de six ordres : *Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales* (Paul et *al.* 2012). Le phylum *Euryarchaeota* comprend des archées méthanogènes hyperthermophiles ou thermophiles appartenant à l'ordre *Methanococcales*, qui a été isolé de divers environnements hydrothermaux marins, y compris *Methanococcus igneus*, *Methanotorris formicicus*, *Methanothermococcus okinawensis* (Wang et *al.*, 2020).

Parmi les *Euryarchaeota* non méthanogènes les *Thermococcales* qui constituent un groupe distinctif et unique de micro-organismes hyperthermophiles au sein des *Thermocoques* (Kecha et *al.*, 2007). Les *Thermococcales* sont des Cocci mobiles qui se développent généralement dans des milieux contenant des peptides, de la chitine, de l'amidon ou du pyruvate, en utilisant du soufre ou de l'hydrogène comme accepteur final d'électrons (Makarova et *al.*, 2021). Ces microorganismes sont obligatoirement hétérotrophes, dépendant du soufre et se développe à des températures allant de 50 à plus de 100°C. Cet ordre archéen est actuellement

composé de deux genres majeurs: *Thermococcus* et *Pyrococcus* et un troisième genre, *Paleococcus* (Kecha et al., 2007). *Thermococcus kodakarensis* croît entre 60 et 102°C, avec une température optimale de croissance de 85 °C. *T. kodakarensis* présente une source de nouvelles enzymes industrielles thermostables. *T. kodakarensis* constitue une alternative pertinente sur le plan industriel de la production de biocarburants. Il présente un fort potentiel de production d'hydrogène. L'archéon génère de l'hydrogène à un taux significativement plus élevé lorsqu'il est cultivé dans un milieu de croissance additionné de pyruvate ou d'amidon (Rashid and Aslam, 2020).

### V.3.3. Phylum des *Nanoarchaeota*

Les *Nanoarchaeota* habitent une diversité d'environnements telle que les événements thermiques marins et les sources chaudes terrestres. *N. equitans* reste le seul représentant cultivé de ce phylum (Munson-Mc-Gee et al., 2021). *N. equitans* est le premier membre identifié de ce phylum, il a été découvert dans une culture d'enrichissement établie à partir d'échantillons prélevés sur un site hydrothermal au nord de l'Islande. Cet organisme est caractérisé par de petites cellules de 400 nm et l'un des plus petits génomes d'archées connus (Dombrowski et al., 2019).

## VI. Mécanismes d'adaptation chez les thermophiles

La chaleur dénature les enzymes, les macromolécules cellulaires et la bicouche lipidique qui constitue la membrane cytoplasmique (Vavitsas et al., 2022). De ce fait, Les thermophiles doivent développer un ensemble de mécanismes adaptatifs et une stabilité des fonctions physiologiques dans des conditions de température élevée (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, qui leur permettraient de se conserver dans telles températures (Satyanarayana et al., 2013). Les éléments qui confèrent une plus haute tolérance aux thermophiles sont: les membranes cellulaires qui s'enrichissent davantage en acides gras saturés et deviennent plus rigides, des gyrases qui protègent l'ADN contre la dénaturation, ainsi que des protéines chaperonnes pour le maintien du bon repliement des protéines. Les thermophiles engagent des propriétés physiques et des interactions électrostatiques pour maintenir l'activité à des températures élevées et possèdent différentes adaptations, telles que la capacité 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 normales à haute température est essentielle pour que les thermophiles s'adaptent aux conditions de températures élevée (Sang et al., 2020).

### VI.1. Protéines

Les protéines des microorganismes thermophiles ont évolué pour maintenir leur fonction à haute température (Satyanarayana et *al.*, 2013). La stabilité thermique des protéines est améliorée 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 intramoléculaire (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). Les protéines de choc thermique appelées communément, les chaperonnes facilitent la thermostabilité des protéines, elles servent pour replier les protéines partiellement dénaturées (Satyanarayana et *al.*, 2013).

### VI.2. Acides nucléiques

Plusieurs facteurs peuvent se combiner pour fournir une stabilité thermique à l'ADN des thermophiles, y compris des niveaux élevés d'ADN gyrase inverse et 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). Une teneur élevée en G+C dans la région de la tige double brin améliore la thermostabilité des molécules d'ARN (Mehta et *al.*, 2016). Les nucléotides sont les constituants de base des molécules d'acide nucléique et ils contiennent soit une base purine (adénine/guanine) soit une base pyrimidique (cytosine/thymine), la thymine et l'adénine se connectent par deux liaisons hydrogène, alors que la cytosine et la guanine sont connectées par trois liaisons hydrogènes, une teneur élevée en GC génomique dans des régions spécifiques (boucles de tige) confère une plus grande stabilité par conséquent, cela pourrait être le principal mécanisme de protection de l'ADN double brin contre la dénaturation chez les extrémophiles (Vavitsas et *al.*, 2022).

### VI.3. Membrane cytoplasmique

Les membranes cytoplasmiques des microorganismes thermophiles doivent être thermostables (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 maintenir une fluidité optimale, les cellules doivent ajuster la composition lipidique quantitativement et qualitativement, de ce fait, les thermophiles contiennent plus d'acides gras saturés à chaîne droite, et moins d'acides gras insaturés (Satyanarayana et *al.*, 2013). Les acides gras saturés forment un environnement hydrophobe plus fort que les graisses insaturées, 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 (Vavitsas et *al.*, 2022). Les lipides qui augmentent

proportionnellement avec l'augmentation de la température de croissance sont nommés «lipides thermophiles» (Mehta et *al.*, 2016).

## VII. Enzymes

### VII.1. Définition d'enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui accélèrent les réactions biochimiques dans les organismes vivants. Elles peuvent également être extraites et utilisées pour catalyser une variété de processus commercial important (Robinson, 2015).

### VII.2. Classes d'enzymes

La classification des enzymes suit la nomenclature CE (Commission des Enzymes). Les enzymes sont classées en fonction des réactions catalysées et six classes d'enzymes ont été définies: les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases et les ligases. En août 2018, une septième classe d'enzymes qui regroupe les translocases a été intégrée par la CE dans la classification conventionnelle. Les enzymes jouent un rôle essentiel dans plusieurs processus, notamment le métabolisme, l'expression des gènes, la division cellulaire et les réactions importantes du système immunitaire. Elles sont employées dans l'industrie de la biotechnologie et dans la médecine pour le diagnostic (Vandenberghe et *al.*, 2020).

**Tableau II:** Principales classes d'enzymes dans le système CE (Singh et *al.*, 2016; Vandenberghe et *al.*, 2020).

Classe	Exemple d'enzyme	Type de Réactions
<b>Oxydoréductases</b>	Oxydases, oxygénases, peroxydases	Oxydation/réduction
<b>Transférases</b>	Transaminase, méthyltransférases	Transfert de groupes d'atomes d'une molécule à une autre
<b>Hydrolases</b>	Protéases, amylases, lipases, phosphatases	Clivage hydrolytique des liaisons
<b>Lyases</b>	Hydratases, déshydratases, décarboxylases	Clivage non hydrolytique par Réactions d'élimination ou d'addition
<b>Isomérases</b>	Épimérases, racémases	Transfert de groupe d'une position à une autre dans une molécule
<b>Ligases</b>	Synthétases, ligases, carboxylase	Jonction de deux molécules
<b>Translocase</b>	Transporteurs de type ABC	Translocation d'ions ou de molécules; à travers les membranes cellulaire

### VII.3. Enzymes thermostables

La plupart des enzymes industrielles ont une action hydrolytique. Elles sont principalement utilisées pour la dégradation de diverses substances naturelles. Les microorganismes thermophiles sont des sources d'enzymes thermostables telles que les amylases, les cellulases, les chitinases, les pectinases, les xylanases, les protéases, les lipases et les ADN polymérase. Ces enzymes ont des applications dans les procédés industriels, à savoir les industries de l'amidon, du textile, des détergents, de la boulangerie, du traitement des eaux usées, de la production de bioéthanol, du papier et de l'industrie alimentaire (Soy et *al.*, 2019). Elles permettent aux processus industriels de se rapprocher des processus doux et efficaces qui se déroulent dans la nature (Dumorné et *al.*, 2017).

#### VII.3.1. Protéases

Les protéases (EC 3.4) sont l'une des classes les plus importantes d'enzymes commerciales représentant près d'un quart de la fabrication totale d'enzymes dans le monde. Elles hydrolysent les protéines en acides aminés et peptides libres, elles ont différents domaines d'application. Les protéases sont largement utilisées en industries de détergents, de l'alimentation, du cuir, de la viande et du lait, ainsi que dans les applications photographiques, aliments pour animaux de compagnie, les études médicales et moléculaires (Tarrahimofrad et *al.*, 2020). L'utilisation des protéases stables dans l'industrie des détergents est l'un des domaines les plus prometteurs, car elles sont assez résistantes à des températures et des valeurs de pH élevées, elles sont principalement utilisées comme détachant, par conséquent, leur utilisation peut contribuer à l'amélioration significative des applications respectueuses de l'environnement dans l'industrie des détergents et réduire l'utilisation des substances toxiques (Oztas Gulmus and Gormez, 2020). Ces enzymes peuvent être isolées à partir de sources eucaryotes et procaryotes (Tarrahimofrad et *al.*, 2020). Les microorganismes, grâce à leurs avantages économiques et techniques, sont la principale source de production de protéases (Tarrahimofrad et *al.*, 2020). Les bio-détergents récents renferment des enzymes telles que l'amylase et la protéase. À titre d'exemple, la protéase des bactéries alcalophiles pourrait être utilisée dans l'industrie des détergents avec une gamme de pH 8-11 pour cette enzyme, et supporte également une température de 70°C, et une concentration en sel de 10%, ce qui représente un avantage par rapport à l'actuel marché des enzymes mésophiles (Dumorné et *al.*, 2017). Un autre exemple qui illustre bien l'importance de ces bactéries thermophiles, *Geobacillus* qui se développent à des températures beaucoup plus élevées que *Bacillus*, et les protéases produites par *Geobacillus* ont une structure et une fonction générale similaire à celle de *Bacillus subtilis* mais avec une stabilité et une activité beaucoup plus importante à des températures plus élevées (Suleiman et *al.*, 2020).

#### VII.3.2. Chitinases

Les chitinases dégradent les liaisons  $\beta$ -1, 4 de la chitine. Elles sont classées en endochitinase (EC 3.2.1.14) et exochitinase (EC 3.2.1.52). Les chitinases dégradent la chitine insoluble en chito-oligomères, les chitinases thermostables peuvent résister à des températures

élevées et maintiennent leur stabilité pendant de longues périodes. De par leur fonction, ces enzymes agissent comme agents de lutte biologique contre les champignons pathogènes et les ravageurs envahissants comme alternative aux fongicides et insecticides chimiques conventionnels. Elles ont d'autres rôles fonctionnels dans la gestion des déchets de coquillages, la génération de protoplasmes fongiques et la production de protéines unicellulaires (Mathew *et al.*, 2021).

### VII.3.3. Cellulases

Les cellulases sont des enzymes hydrolysant la liaison  $\beta$ -1,4 glycosidique de la cellulose en glucose (Sahoo *et al.*, 2020). Elles 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). Grâce à ces enzymes la cellulose peut être transformée par des procédés biotechnologiques en produits respectueux de l'environnement et de grande valeur, tels que les papiers, les textiles, les aliments pour animaux, les biocarburants et autres (Zarafeta *et al.*, 2016). Elles sont largement utilisées dans différents domaines et sont les meilleures candidates pour les processus industriels de conversion de la biomasse car, elles fournissent à température élevée, une stabilité thermique permettant une activité spécifique plus élevée et un temps d'hydrolyse plus court (Potprommanee *et al.*, 2017; Sahoo *et al.*, 2020). Comparées aux mésophiles, les thermophiles sont considérés comme plus robustes pour la dégradation de la cellulose et la production d'hydrogène. En particulier, le taux de cellulolyse est vraisemblablement plus rapide à des températures élevées (Mehta *et al.*, 2016). Les enzymes cellulolytiques ont été employées dans l'extraction de pigments et de composés aromatiques dans la production de jus de fruits et de vin; comme additif de détergents pour laver les jeans; dans le prétraitement de la biomasse pour améliorer la qualité nutritionnelle des fourrages destinés à l'alimentation animale; dans l'industrie textile dans le processus de polissage des fibres de coton et pour la saccharification des résidus lignocellulosiques pour obtenir des sucres réducteurs.

### VII.3.4. Lipases

Les lipases (EC 3.1.1.3) connues sous le nom de triacylglycérol acyl-hydrolase, agissent sur les liaisons ester carboxyliques, elles font partie de la famille des hydrolases et la classe des serines hydrolases (Chandra *et al.*, 2020). Elles sont capables d'effectuer une grande gamme spécifique de biotransformation (Rabbani *et al.*, 2014). En plus de l'activité hydrolytique, elles présentent une activité d'estérification, d'aminolyse et d'alcoolyse réactions importantes 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 largement 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 thermostables synthétisent de l'ester de salicylate de méthyle utilisé comme agent anesthésique local et désinfectant, utilisé dans les dentifrices, les bains de bouche, les parfums et les agents aromatisants. Le salicylate de méthyle à diverses applications médicales et est largement utilisé pour contrôler les douleurs musculaires (Bhardwaj et *al.*, 2017). Elles sont aussi utilisées dans plusieurs industries telles que les produits laitiers, les aliments, les boissons, la bioremédiation, les biocarburants et les produits pharmaceutiques (Chandra et *al.*, 2020), dans la chimie fine, la chimie du pétrole, les industries des détergents et le biodiesel (Bhardwaj et *al.*, 2017). Ce dernier est produit par les lipases de *Pseudomonas fluorescens*, de *Burkholderia capacia* et de *Bacillus thermocatenulatus* (Borrelli and Trono, 2015).

Les lipases issues de thermophiles restent actives dans les solvants organiques qui améliorent leur potentiel et leur flexibilité en tant que biocatalyseurs. Leur application principale est la synthèse de précurseurs de composés pharmaceutiquement 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 sont actives à des températures, pH, salinité et pression extrême (Verma et *al.*, 2021).

### VII.3.5. Xylanases

Les xylanases (EC3.2.1.8), sont des enzymes hydrolytiques qui catalysent l'hydrolyse de la liaison glycosidiques  $\beta$ -1,4 du xylane, un polysaccharide de la paroi cellulaire végétale de l'hémicellulose, en xylose qui est un monosaccharide à cinq carbones (Basit et *al.*, 2018). Le complexe xylanolytique comprend l'endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase (EC 3.2.1.8) qui hydrolyse les liaisons  $\beta$ -1,4-glycosidiques à l'intérieur du squelette xylane produisant des xylo-oligosaccharides qui sont convertis en unités xylose par 1,4- $\beta$ -D-xylosidase (EC 3.2.1.37) (Gomes et *al.*, 2016). Et dépolymérisent l'hétéro-polysaccharide en monosaccharides, et cela pour des applications industrielles, ce complexe comprend aussi, l' $\alpha$ -l-arabinofuranosidase, l' $\alpha$ -glucuronidase, p-coumarique estérase, acide férulique estérase et acétylxylane estérase (Okpara, 2022). Ces hydrolases sont synthétisées par une grande variété d'organismes, notamment, les protozoaires et les mollusques et par des microorganismes (Algan et *al.*, 2021), comme les champignons thermophiles, les levures et les bactéries thermophiles (Ajeje et *al.*, 2021). Les xylanases à usage industriel sont principalement dérivées de sources microbiennes (Okpara, 2022). Elles sont appliquées dans les procédés biotechnologiques tels que le bio-blanchiment de la pâte à papier, la production d'aliments pour animaux, la clarification des jus de fruits, la panification, la production de films d'emballage et la production de tensioactifs biodégradables (Gomes et *al.*, 2016).

### VII.3.6. Amylases

Les amylases (EC 3.2.1.1), sont des enzymes qui dégradent les liaisons  $\alpha$ -1,4-O-glycosidiques internes de l'amidon pour donner divers produits, dont le glucose et le maltose. Ces enzymes sont obtenues de diverses sources, végétales, animales et microbiennes (Al-Johani

et *al.*, 2016). Elles représentent 25% du marché mondial des enzymes (Soy et *al.*, 2019). Les bactéries thermophiles, et particulièrement les espèces de *Bacillus*, ont été reconnues comme étant de bonnes sources économiques d'amylases thermostables servant dans diverses applications industrielles (Yassin et *al.*, 2021). Elles sont utilisées dans les procédés biotechnologiques, car elles sont stables à des températures dépassant les 60°C, permettant ainsi une réaction enzymatique améliorée (Soy et *al.*, 2019). Parmi les bactéries productrices d'amylases thermotolérantes, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus licheniformis* (Soy et *al.*, 2019).

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'enzyme 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), leur utilisation dans ces procédés industriels minimise le risque de contamination (Yassin et *al.*, 2021).

### VII.3.7. Kératinases

Les enzymes kératolytiques sont des protéases connues sous le nom de kératinases (EC 3.4.21/24/99.11) (Gopinath et *al.*, 2015). Elles sont un groupe de sérines ou de métallo peptidases qui peuvent dégrader la structure insoluble constituant les substrats de kératine qui est une protéine de structure de la plume, de la laine qui est connue pour sa grande stabilité (Bouacem et *al.*, 2016). On peut les obtenir de bactéries, d'actinomycètes et de champignons (Gopinath et *al.*, 2015). Les plus importantes bactéries productrices d'enzymes kératolytiques sont les bactéries du groupe *Bacillus*, dont *B. subtilis* et *B. licheniformis* (Sypka et *al.*, 2021). Les kératinases sont utilisées comme suppléments protéiques, le traitement des textiles, la formulation des détergents, les industries pharmaceutiques et biomédicales (Gopinath et *al.*, 2015). Ces enzymes sont utilisées dans la fabrication du cuir et dans les opérations de pré-tannage telles que l'épilation, afin d'éviter les dangers causés par les effluents de la tannerie et pour améliorer la qualité du produit final, cette alternative fournit une stratégie plus efficace, sûre et respectueuse de l'environnement pour la préservation des peaux brutes et le traitement efficace du cuir (Bouacem et *al.*, 2016).

### VII.3.8. Estérases

Les estérases (EC3.1) sont des enzymes hydrolytiques qui catalysent l'hydrolyse des esters en alcool et en acide (Okpara, 2022). Elles sont présentes chez les animaux, les plantes et les microorganismes. Elles sont largement utilisées dans les industries alimentaires (Singh et *al.*, 2019). Les carboxyl-estérases sont des enzymes industrielles précieuses, leur rôle physiologique, et de former des liaisons estériques ou des réactions de transestérification en

milieu non aqueux, suite à l'inversion thermodynamique de la voie réactionnelle d'hydrolyse, grâce à ses caractéristiques, elles jouent le rôle des biocatalyseurs protagonistes dans les industries des saveurs et des arômes, de l'alimentation, du biodiesel, de la chimie fine, des cosmétiques, des détergents et de la pharmacie (Zarafeta et *al.*, 2016). Les estérases de *Geoacillus thermodenitrifiants* NG80-2 peuvent être utilisées pour l'hydrolyse et les modifications d'acides gras de longueur inférieure à 12 atomes de carbone dans les industries alimentaires et papetières et dans les procédés de bioremédiation (Curci et *al.*, 2019).

### VII.4. Applications des enzymes thermostables

Les sources chaudes représentent une mine de microorganismes thermophiles bénéfiques, bactéries et archées, produisant de précieuses biomolécules et enzymes biotechnologiques. Elles sont utilisées dans l'industrie pour leur capacité à résister aux températures élevées et pour leur thermostabilité (Saghatelyan et *al.*, 2021). Les enzymes sont capables de catalyser des réactions biochimiques à des températures extrêmes (Oztas Gulmus and Gormez, 2020). Conduisant à des avancées importantes en biotechnologie, telles que le test de réaction en chaîne par polymérase (PCR).

#### VII.4.1. Biologie moléculaire: Taq polymérase

L'enzyme thermostable la plus connue pour des applications biotechnologiques est la Taq ou l'ADN polymérase, produite à partir de *Thermus aquaticus* (Pandey et *al.*, 2015). Elle a été isolée pour la première fois, du parc national de Yellowstone dans la Montana, aux Etats-Unis (Ishino and Ishino, 2014). L'ADN polymérase a permis le développement d'outils d'amplification et de séquençage qui a révolutionné presque tous les domaines de la biologie et de la médecine (Brumm et *al.*, 2015). Elle permet des manipulations d'ADN, telles que le clonage de l'ADN, le séquençage, le marquage de l'ADN, la mutagenèse et elle a contribué au développement des techniques de génie génétique. L'ADN polymérase thermostable est une enzyme essentielle pour la réaction en chaîne par polymérase (PCR) et le séquençage (Yamagami et *al.*, 2016).

#### VII.4.2. Nucléases thermostables

Le système CRISPR-Cas est le système immunitaire microbien qui protège les microorganismes contre les invasions d'acides nucléiques tels que: les génomes de virus et les éléments génétiques mobiles (plasmides) (Croteau et *al.*, 2018; Zhao et *al.*, 2020). Composés d'un réseau CRISPR et de gènes CAS (Adalsteinsson et *al.*, 2021). Les locus CRISPR contiennent une mine d'informations qui serviraient dans le typage de souches microbiennes et dans l'étude des interactions entre les bactéries et leurs habitats (Croteau et *al.*, 2018). Les protéines Cas sont des nucléases qui effectuent des cassures double brin d'ADN, à des locus génomiques spécifiques, elles fournissent un moyen efficace d'introduction de mutations de perte de fonction ciblées, à des sites spécifiques du génome, largement exploitées pour concevoir les génomes d'organismes de l'arbre de la vie (Schmidt et *al.*, 2019).

Le réseau CRISPR contient des séquences courtes appelées espaceurs, qui sont complémentaires aux séquences d'acides nucléiques étrangers appelées proto-espaceurs (Adalsteinsson et *al.*, 2021). Il est doté de capacités de couper efficacement à des endroits bien précis de l'acide nucléique. Des parties de ce système microbien ont été exploitées pour développer un puissant outil d'étude du génome de plusieurs organismes (Croteau et *al.*, 2018). Chez certains thermophiles, les systèmes CRISPR-Cas, notamment, Cas9 promettent des applications à des températures élevées, nécessitant une grande stabilité. La GeoCas9 et ThermoCas9 sont deux protéines Cas9 issues de thermophiles, récemment découvertes, qui ont une grande stabilité, et qui ont permis l'étude du génome dans des organismes thermophiles, elles ont été identifiées par séquençage d'échantillons environnementaux, et leurs hôtes vivent à des températures de 65 et 70°C, respectivement (Schmidt et *al.*, 2019). À ces deux protéines s'ajoute une troisième qui a été mise en évidence en 2019, chez *Ignavibacterium* hyperthermophile, isolée du Lower Geyser Basin du parc national de Yellowstone, où les températures dépassent 90°C appelée IgnaviCas9, elle est active jusqu'à 100°C *in vitro*, sa plage de température est la plus large jamais observée pour un système CRISPR-Cas9, ouvrant ainsi des applications potentielles de biologie moléculaire (Schmidt et *al.*, 2019). Désormais, IgnaviCas9 peut être utilisée dans la préparation bactérienne pour éliminer l'ADNc indésirable de l'ARNr ribosomal 16s avec un minimum d'étapes et dans l'amélioration de la biologie moléculaire grâce à sa thermostabilité exceptionnelle elle sera utilisée pour épuiser les amplicons indésirables lors de l'amplification. IgnaviCas9 est un ajout intéressant à la boîte à outils CRISPR-Cas9 et élargit sa plage de température (Schmidt et *al.*, 2019).

### VII.4.3. Production de biocarburants

Le bioéthanol est le carburant renouvelable le plus répandu, l'éthanol cellulosique est un biocarburant alternatif, aujourd'hui, est considéré comme l'énergie du futur dans le monde entier, généralement dérivé de l'amidon aux États-Unis ou de la canne à sucre de saccharose au Brésil et en Amérique latine. L'utilisation de la biomasse entière pour obtenir des carburants à base d'alcool nécessite une conversion efficace de la matière lignocellulosique en sucres pentoses et hexoses fermentescibles (Gomes et *al.*, 2016).

Les thermophiles et leurs enzymes ont un grand potentiel pour la bioconversion de la lignocellulose en bioéthanol (Zhu et *al.*, 2020). Les bactéries anaérobies thermophiles pourraient être des candidats prometteurs pour la conversion de l'hémicellulose ou de ses monomères, xylose, arabinose, mannose et galactose en éthanol avec un rendement et une productivité satisfaisante (Mehta et *al.*, 2016). Certaines bactéries thermophiles peuvent produire simultanément de la cellulase et de la xylanase qui hydrolysent complètement la biomasse à haute température (Zhu et *al.*, 2020). Les cellulases thermophiles sont utilisées pour produire des sucres fermentescibles à partir de déchets cellulosiques, actuellement les travaux sont concentrés sur la production de biocarburants tels que le biogaz, le bioéthanol, le biodiesel et les piles à combustible à partir de ces sucres (Gomes et *al.*, 2016).

### VII.4.4. Industrie du cuir

Les enzymes sont un moyen efficace pour améliorer la qualité du cuir et pour réduire les déchets éliminés des différentes étapes de la transformation du cuir causant des risques sur la santé et l'environnement. Les enzymes utilisées dans les industries du cuir sont les lipases neutres, les protéases neutres et les protéases alcalines. Les lipases sont utilisées lors de dégraissage pour éliminer les graisses. Les protéases neutres et alcalines, toutes les deux sont utilisées dans l'épilation (Singh et *al.*, 2016). Les kératinases trouvent plusieurs applications dans les différentes étapes du traitement du cuir.

À titre d'exemple, Bouacem et *al.* (2016) ont montré dans leur étude qu'une nouvelle kératinase KERCA, produite par la souche anaérobie thermophile *Caldicoprobacter algeriensis* TH7C1<sup>T</sup>, isolée d'une source hydrothermale à Guelma, présente des capacités d'épilation des peaux de chèvre, de mouton et de bovin. Cette enzyme pourrait être une bonne candidate dans le traitement du cuir.

### VII.4.5. Industrie alimentaire

Les estérases, les lipases et les catalases sont utilisées dans les industries laitières pour améliorer la durée de conservation et la qualité des produits laitiers (Thapa et *al.*, 2019). Dans la panification, les xylanases sont utilisées en raison de leurs avantages potentiels d'augmenter le volume du pain et d'aider à améliorer la qualité du pain, elles peuvent réduire le temps de cuisson et augmenter le rendement (Ajeje et *al.*, 2021).

### VII.4.6. Industrie pharmaceutique

Les enzymes sont largement utilisées comme médicament dans les problèmes de santé associées aux troubles digestifs, et dans les procédures de diagnostic telles que les tests ELISA et les Kits de tests du diabète. Les lipases sont utilisées dans la synthèse d'alcools, d'acides et d'esters (Singh et *al.*, 2016).

### VII.4.7. Industrie textile

L'enzyme laccase purifiée à partir de *Geobacillus thermocatenulatus* MS5 a une activité catalytique très élevée, très stable à différentes températures elle peut être utilisée largement et efficacement dans l'élimination des colorants qui causent la pollution de l'environnement (Mehta et *al.*, 2016). Les oxydoréductases sont impliquées dans le bio-blanchissement et la décoloration des colorants des tissus (Singh et *al.*, 2016).

### VII.4.8. Industrie papetière

Les xylanases sont utilisées dans l'Industrie papetière pour différents processus, y compris le bio-blanchissement de la pâte et le désencrage du papier recyclé. Le traitement à la xylanase réduit la consommation de produits chimiques pendant le blanchissement et augmente la qualité de la pâte (Kumar, 2021).

**VII.4.9. Industrie des détergents**

L'application des enzymes dans la fabrication des détergents améliore la capacité des détergents à éliminer les taches tenaces et rend également les détergents respectueux de l'environnement. Les amylases sont le deuxième type d'enzymes utilisées dans la formulation des détergents et 90 % de tous les détergents liquides contiennent ces enzymes. Ces dernières sont utilisées pour la lessive et le lavage automatique de la vaisselle pour nettoyer les résidus de féculents tels que la crème anglaise, les sauces, les pommes de terre et le chocolat. Les lipases leur addition aux détergents sont principalement utilisée dans les blanchisseries et les lave-vaisselle ménagers (Gurung et al., 2013).

Le tableau ci-dessous résume un peu quelques enzymes thermostables et leurs applications.

**Tableau III:** Enzymes thermostables et leurs applications ( Nigam, 2013; Jin et al., 2019; Rekadwad and Gonzalez, 2019; Janusz et al., 2020; Ajeje et al., 2021; Mathew et al., 2021).

Microorganismes	Enzymes	Applications
<i>Bacillus sp.</i> <i>Geobacillus sp.</i>	Amylases	Les industries de la liquéfaction de l'amidon, du papier, de l'alimentation, du sucre et l'industrie pharmaceutique
<i>Bacillus, Geobacillus, Caldibacillus, Acidothermus, Caldocellum et Clostridium</i>	Cellulases	Production de biocarburants, industrie papetière et les industries alimentaires
<i>Thermoactinomyces halophilus, Bacillus sp, Humicola spp.</i>	Xylanases	La clarification des jus de fruits, l'amélioration de la digestion du rumen et la bioconversion des résidus agricoles lignocellulosiques en carburants et produits chimiques, industries alimentaires, de la pâte à papier, du papier et du textile, l'utilisation des résidus agro-industriels et la production d'éthanol et d'aliments pour animaux
<i>Thermus thermophilus</i>	Laccases	La bioremédiation, le contrôle de la pollution et dans le traitement des effluents industriels contenant des produits chimiques dangereux tels que les colorants textiles, les phénols et autres xénobiotiques
<i>Clostridium thermocellum</i>	Chitinases	Traitement des eaux usées, le traitement des textiles et le développement de produits photographiques, de matériaux de

		construction et d'agents chélateurs de métaux lourds
<i>Geobacillus</i> sp.	Lipases	Industrie alimentaire, détergents, cosmétique, parfumerie pharmaceutique, des pâtes et papiers et de la chimie
<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Clostridium</i>	Protéases	Industrie des détergents, l'industrie alimentaire, la transformation du cuir et l'industrie pharmaceutique
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Xanthomonas</i>	Kératinases	La production d'aliments pour animaux, la transformation des textiles, la formulation de détergents, la fabrication du cuir et la médecine
<i>Thermus filiformis</i>	Estérases	La synthèse de parfums et d'antioxydants

**Tableau IV:** Enzymes thermostables avec leur température optimale (Sharma et al., 2019).

Microorganismes	Enzyme produit	Température optimale
<i>Thermus thermophilus</i>	$\beta$ -galactosidase	85°C
<i>Bacillus licheniformis</i>	Cellulase	70°C
<i>Bacillus subtilis</i>	$\beta$ -Mannanase	60°C
<i>Rhizopus oryzae</i>	$\alpha$ -Amylase	-
<i>Mycothermus thermophilus</i>	Xylanases	65°C
<i>Geobacillus</i> sp	Cellulase	60°C
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	Lipase	60°C
<i>Aeribacillus pallidus</i>	Protéase	60°C

### VIII. Exopolysaccharides

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères biologiques de haut poids moléculaire sécrétés par des microorganismes dans leur environnement pour faire face aux conditions environnementales difficiles (Nguyen et al., 2020). Ils forment une couche entourant la cellule, assurant une protection efficace contre les hautes ou basses températures, salinité, ou contre d'éventuels prédateurs (Poli et al., 2010). Les EPS sont une forme d'adaptation pour aider les communautés microbiennes à supporter les températures extrêmes. Ils proviennent de diverses sources: bactériennes, champignons, algues, plantes. Au cours des dernières années, divers exopolysaccharides microbiens marins se sont révélés être de bons candidats biotechnologiques (Casillo et al., 2018).

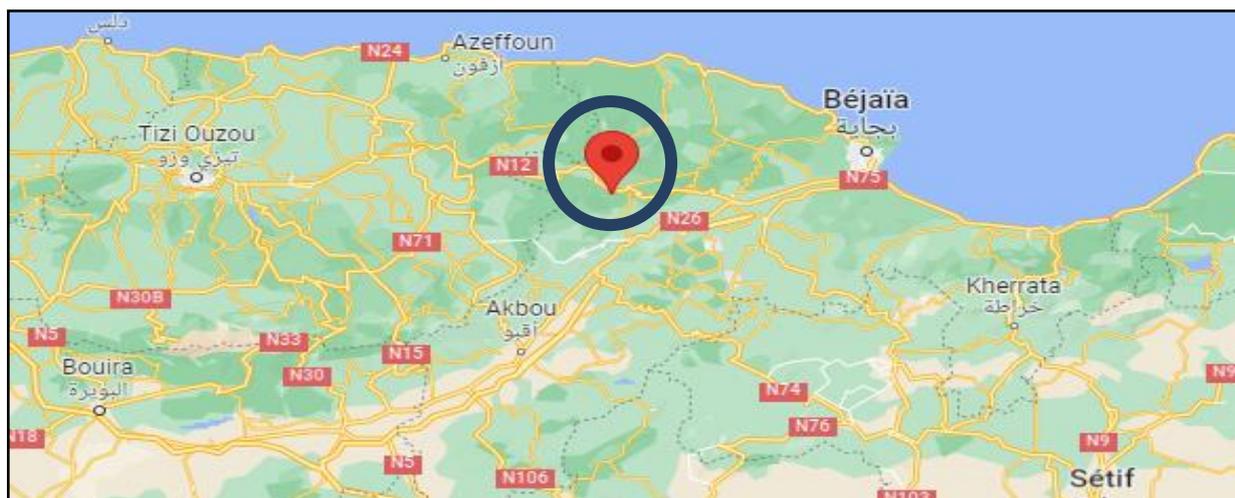
Les EPS sont de nature glucidique mais peuvent incorporer d'autres composants tels que des glycolipides et des protéines (Asgher et al., 2020). Les EPS microbiens ont un large domaine d'application, notamment, les industries alimentaires, pharmaceutique et chimique

(Sran et *al.*, 2019). Ils sont d'une importance industrielle grâce au faible risque de pathogénicité et de leur courte période de productivité (Wang et *al.*, 2021). En industrie alimentaire, ils sont utilisés en tant qu'agents visqueux, stabilisants et émulsifiants pour améliorer la propriété rhéologique, la texture et la sensibilité du pain et des produits laitiers fermentés tels que le yaourt et le fromage (Nguyen et *al.*, 2020), et aussi comme épaississants, et gélifiants. Ils sont des anti-inflammatoires et antioxydants efficaces (Han et *al.*, 2015). Ils fournissent de très bonnes substances anti-tumorales et prébiotiques d'intérêt pharmacologique et médical, notamment, les polysaccharides sulfatés. Ils sont de bons agents immuno-modulateurs, immuno-stimulateurs, antiviraux, altèrent la réplication du HSV-2 dans les cellules mononucléaires du sang humain. En industries cosmétiques et pétrolières, ils sont utilisés comme cryoprotecteurs et antigels (Casillo et *al.*, 2018). Les EPS provenant de différentes espèces bactériennes deviennent de plus en plus demandées en tant que biopolymère industriels émergents (Han et *al.*, 2015), avec une perspective prometteuse dans le domaine de la bioremédiation. Certaines souches isolées des sources hydrothermales profondes ont une résistance aux métaux lourds grâce à leurs EPS présentant une capacité de lier les métaux et les substances toxiques. La souche *Bacillus licheniformis* B3-15 est une halophile thermotolérante, isolée des sources chaudes marines peu profondes de l'île de Vulcano (Italie), produisant un polysaccharide exo-cellulaire capable d'immobiliser le métal comme le cadmium (Casillo et *al.*, 2018).

# *Matériel et Méthodes*

### I. Site d'étude

La source thermale Hammam Essalihine, comme le montre la figure 9, est située dans la localité d'Assif El Hammam, dans la commune d'Adekar à 60 km de Béjaïa et à 75 km de Tizi-Ouzou au nord de l'Algérie. Hammam Essalihine, fait partie des plus importantes stations thermales de la Kabylie. Cette source thermale est reconnue pour ses caractéristiques thérapeutiques, faisant d'elle une destination incontournable pour un nombre important de visiteurs chaque année.



**Figure 9:** Localisation de la station thermale Hammam Essalihine [11].

#### I.1. Échantillonnage

Un échantillon d'eau a été prélevé aseptiquement dans un flacon de verre stérile à partir des eaux thermales du Hammam Essalihine à Assif El Hammam dans la wilaya de Béjaïa. Puis il a été transporté au laboratoire pédagogique de microbiologie de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, où nous avons effectué un stage d'une durée de deux mois (Mai-juin). Et cela, dans le but d'étudier le potentiel enzymatique des souches bactériennes thermophiles isolées à partir de ces eaux thermales. Ce travail consiste en l'étude physico-chimique et microbiologique de l'eau thermale et la mise en évidence des caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques des bactéries thermophiles et criblage de leurs activités enzymatiques. La figure 10 est une photographie du point du prélèvement de l'échantillon.



**Figure 10:** Site du prélèvement au niveau de la source thermale Hammam Essalihine.

## II. Matériel

### II.1. Matériel biologique

Les souches bactériennes utilisées ont été isolées à partir d'un échantillon d'eau de la station thermale Hammam Essalihine, Assif El Hammam Adekar Bejaïa.

### II.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé est cité en annexe 1.

## III. Méthodes

### III.1. Analyse physico-chimique

#### III.1.1. Appréciation de la qualité organoleptique

La couleur et l'aspect de cette eau ont été appréciés visuellement sur les flacons de l'échantillon, et l'odeur est vérifiée par odorat.

#### III.1.2. Paramètres physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques analysés étaient la température (T), le potentiel d'hydrogène (pH), la turbidité, l'oxygène dissous (OD), la conductivité et les résidus secs. Un échantillon d'eau de 1 litre a été analysé en laboratoire pour déterminer ces paramètres.

##### III.1.2.1. Mesure de la température et du potentiel d'hydrogène

La température et le pH de l'eau ont été mesurés *in situ* à l'aide d'un thermomètre et d'un pH-mètre de terrain.

##### III.1.2.2. Mesure de la turbidité

La turbidité est une caractéristique optique de l'eau, à savoir sa capacité à diffuser ou à absorber la lumière incidente. La turbidité est un des facteurs de la couleur de l'eau, elle est due à la présence dans l'eau de particules en suspension (argile, limon, microorganismes) [12].

L'appareil utilisé est le turbidimètre illustré en annexe 6. Les résultats sont exprimés en unité de turbidité néphélométrique (NTU).

##### III.1.2.3. Taux d'oxygène dissout

La mesure de l'oxygène dissous peut se faire *in situ* ou au laboratoire avec un oxymètre (annexe 6). Dans notre étude cette analyse a été effectuée au laboratoire.

### III.1.2.4. Résidu sec

Un volume de 250 mL a été chauffé à 180 °C dans un cristallisoir pendant 4 heures, le poids du cristallisoir est mesuré étant vide et après évaporation complète de l'eau la différence du poids du récipient avant et après le séchage représente le poids net des résidus sec que cette eau contient. Le poids obtenu sera multiplié par 4 pour l'exprimer en mg/L.

### III.1.2.5. Conductivité

La conductivité est la mesure de la capacité de l'eau à laisser passer le flux électrique. Cette capacité est directement liée à la concentration d'ions dans l'eau (Wetzel, 2001). La mesure de la conductivité est faite au laboratoire de chimie, avec un conductimètre (annexe 6). L'électrode est plongée dans l'échantillon ensuite la conductivité de notre échantillon est lue directement sur l'appareil en ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). La lecture est faite à une température ambiante de 28,8 °C.

### III.1.3. Détermination de l'alcalinité

L'alcalinité d'une eau est due aux ions carbonates ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) et bicarbonates ( $\text{HCO}_3^-$ ), elle est dosée par un acide fort.

#### III.1.3.1. Titre alcalimétrique et titre alcalimétrique complet

Le titre alcalimétrique (TA) est le volume en mL d'acide nécessaire pour doser 100 mL d'eau en présence de phénolphtaléine. Elle mesure la concentration en carbonate. Le titre alcalimétrique complet (TAC) est le volume d'acide fort nécessaire à doser 100 mL d'eau en présence de méthyle-orange, elle mesure les ions hydrogencarbonate.

Ajouter à 100 mL de l'échantillon quelques gouttes de phénolphtaléine.

-Absence de couleur rose: Le résultat est négatif et  $\text{TA}=0$  °F, on continue la recherche du TAC.  
-Apparition d'une couleur rose: effectuer un dosage avec l'acide chlorhydrique HCl à 0.1M, jusqu'à disparition totale de la couleur et noter le volume  $V_1$  ou ajouter quelques gouttes de méthyle-orange, la couleur vire au jaune, doser avec du HCl à 0,1 M jusqu'à la disparition de la couleur jaune et l'apparition de la couleur rose et noter le volume  $V_2$ .

#### ➤ Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en mmol d'alcalinité capable de réagir avec les ions d'hydrogène par litre d'eau est donné par la formule suivante:

$$TA = \frac{C(\text{HCl}) \times V(\text{HCl}) \times 1000}{V(\text{ech})}$$

**C (HCl):** Concentration en mol/L de la solution HCl.

**V<sub>1</sub> (HCl):** Volume de la solution HCl en mL versé pour avoir le virage du menthyle-orange.

**V (ech):** Volume de l'échantillon (100 mL).

$$TAC = \frac{C (HCl) \times V(HCl) \times 1000}{V(ech)}$$

**C (HCl):** Concentration en mol/L de la solution HCl.

**V<sub>2</sub> (HCl):** Volume de la solution HCl en mL versé pour avoir le virage du menthyle-orange.

**V (ech) :** Volume de l'échantillon (100 mL).

### III.1.4. Détermination de la dureté

La dureté de l'eau est également appelée titre hydrotimétrique (TH) et se mesure le plus souvent en degrés français (°f). Elle correspond à la concentration en magnésium et en ions calcium dans l'eau [13].

Les composées doivent être introduits dans l'ordre, ajouter 4 mL de la solution tampon ammoniacal pH = 10 dans 50 mL d'échantillon, puis ajouter un peu du noir Eriochrome T: NET, et noter le changement de la couleur, effectuer un titrage avec la solution EDTA (0.01 mol/L) jusqu'au virage de la coloration, noter le volume V<sub>1</sub> d'EDTA nécessaire. Il est important de titrer lentement en agitant constamment.

#### ➤ Expression des résultats

La concentration totale en calcium et magnésium en mmol/L est donnée par la formule suivante :

$$TH = \frac{C (EDTA) \times V(EDTA) \times 1000}{V(ech)}$$

**C (EDTA):** Concentration en mol/L de la solution d'EDTA.

**V<sub>2</sub> (EDTA):** Volume en mL de la chute de la burette.

**V (ech):** Volume de l'échantillon.

#### III.1.4.1. Détermination de la dureté calcique

Les composés du dosage doivent être incorporés dans l'ordre indiqué. Ajouter dans 50 mL d'eau à analyser, 2 mL de la solution de NaOH à 2M, plus une petite quantité d'indicateur coloré: le murexide, puis noter le virage de la couleur. Procéder au titrage avec la solution de l'EDTA à (0.01mol/L) jusqu'au virage de la coloration. Noter le volume V<sub>1</sub> d'EDTA nécessaire pour ce titrage, il est nécessaire de titrer lentement en agitant constamment.

### ➤ Expression des résultats

La formule suivante donne la concentration du calcium en mmol/L.

$$[\text{Ca}^{2+}] = \frac{C(\text{EDTA}) \times V(\text{EDTA}) \times 1000}{V(\text{ech})}$$

**C (EDTA):** Concentration en mol/L de la solution d'EDTA.

**V<sub>2</sub>(EDTA):** Volume en mL de la chute de la burette.

**V(ECH):** Volume de l'échantillon.

La concentration de  $\text{Mg}^{2+}$  est déduite par la formule suivante:

$$\text{Dureté de Mg}^{2+} = TH - TH \text{ calcique}$$

### III.1.5. Recherche des ions et des métaux lourds

L'évaluation de la présence des ions et des métaux lourds dans notre eau a été obtenue en ajoutant chaque fois à notre échantillon des réactifs spécifique de chaque métal lourd recherché. Les réactifs utilisés sont cités en annexe 5.

### III.2. Microbiologie des eaux

Cette partie consiste en :

- L'étude microbiologique de la qualité sanitaire de l'eau du Hammam Essalihine.
- Réalisation des isolements à partir des eaux thermales de Hammam Essalihine.
- Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires des souches thermales isolées.

#### III.2.1. Étude de la qualité sanitaire des eaux

Cette analyse 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 V.

Tableau V: Germe recherchés (conditions opératoires).

Germe recherchés	Technique
<b>Flore Mésophile Aérobie Totale (FAMT)</b>	Effectuer des dilutions décimales jusqu'à $10^{-3}$ à partir de la solution mère, chaque dilution sera ensemencée en masse à raison de 1 mL pour 15 mL de PCA, homogénéiser et laisser solidifier Incuber à 30 °C pendant 72 heures (Méthode solide). <b>Lecture:</b> Les colonies sont lenticulaires, de couleur blanche à jaunâtres.
<b>Coliformes Totaux (CT) et Fécaux (CF)</b>	Effectuer des dilutions décimales jusqu'à $10^{-3}$ à partir de la solution mère. Chaque dilution sera ensemencée dans 3 tubes de BCPL par dilution avec 1 mL par tube par la méthode NPP (Nombre le Plus Probable). Incubation à 37 °C pendant 24 h pour les coliformes totaux et 44 °C pour les coliformes fécaux ( <i>E. coli</i> ) (Méthode liquide). <b>Lecture:</b> 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 thermotolérants 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>Streptocoques Fécaux</b>	Effectuer des dilutions décimales jusqu'à $10^{-3}$ à partir de la solution mère, pour chaque dilution réaliser trois ensemencements de 1 mL pour 10 mL de Rothe à raison de trois tubes par dilution incubé à 37 °C pendant 24 à 48 heure (Méthode liquide). <b>Lecture 1:</b> les tubes positifs qui présentent un trouble seront repiqués à raison d'une goutte dans 10 mL de milieu Eva Litsky (test présomptif). <b>Lecture 2:</b> Les tubes qui présenteraient un trouble et un dépôt en pastille violette seront pris comme positifs et serviront pour le repérage du chiffre caractéristique qu'on va lire dans les tables Mac Grady et se traduira par la suite en UFC/mL.
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	Réaliser un enrichissement sur Bouillon Giolitti Cantoni (GC) à raison de 10 ml de solution mère (SM), pour 10 mL de GC, incubation à 37 °C pendant 24 à 48 h, les tubes qui présenteraient un noircissement serviront pour réaliser un isolement sur Chapman et incubé pendant 24 à 48 heures à 37 °C. <b>Lecture:</b> Les colonies de <i>S. aureus</i> apparaissent en jaune doré entourées d'une zone d'acidification.
<b><i>Clostridium sulfito réducteurs</i></b>	Soumettre quatre tubes contenant 5 mL de l'eau (à analyser) à un chauffage de 80 °C pendant 10 min, puis placé les tubes sous un jet d'eau froide. Remplir avec de la gélose viande foie additionnée au préalable avec de l'alun de fer et de sulfite de sodium. Incuber à 44 °C pendant 24 à 48 heures (Lecture à partir de 16 heures). <b>Lecture:</b> Dénombrer le nombre de colonies noires /20 mL d'eau.
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	Déposer 100 µL sur gélose au Cétrimide, ensuite bien étalé au râteau, incubé pendant 48 heures à 37 et à 42 °C. <b>Lecture:</b> Colonies bleues vertes ou verdâtres (colonies fluorescentes). Confirmation sur milieux King A et King B.

### III.2.2. Recherche et isolement

La recherche et l'isolement ont été réalisés sur différents milieux gélosés: gélose nutritive (GN), milieu M1, M2 et nitrate, le pH de ces milieux est ajusté à 7. À partir de la solution mère (SM) des cultures sur 3 boîtes de chaque milieu sont réalisées. 100 µL sont prélevés et étalés à la surface du même milieu gélosé. Les boîtes de Petri sont incubées à 50°C jusqu'à apparition de colonies bactériennes. Les différents milieux gélosés utilisés et leurs compositions sont résumés dans le tableau IV.

**Tableau VI:** Milieux utilisés pour les isolements et leurs compositions.

Milieux	Composition (g/L)
<b>Gélose nutritive (GN).</b>	Extrait de viande (1,0), extrait de levure (2,5), peptone (5), chlorure de sodium (5), Agar Agar (15), 1000 mL, pH =7.
<b>M1</b>	Milieu pré a l'emploi.
<b>M2</b>	Milieu pré a l'emploi.
<b>Nitrate</b>	KNO <sub>3</sub> (2), Glucose (3,6), NH <sub>4</sub> Cl (1).

### III.2.3. Caractérisation des bactéries thermophiles

Après la purification des colonies obtenues, une étude morphologique, physiologique et biochimique a été réalisée pour l'ensemble des souches isolées.

#### III.2.3.1. Étude morphologique

##### III.2.3.1.1. Observation macroscopique

L'étude macroscopique des colonies permet la description de la forme, la taille, la couleur, l'opacité, l'aspect de surface et le contour des colonies.

##### III.2.3.1.2. Observation microscopique

###### III.2.3.1.2.1. Observation à l'état frais

Cette observation permet la détermination de la forme des cellules, de leur mode d'arrangement et de leur mobilité au grossissement (×40). La méthode utilisée est citée en annexe 2.

###### III.2.3.1.2.2. Observation à l'état fixé (coloration de Gram)

C'est une coloration différentielle ou double coloration qui permet de diviser 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 3.

### III.2.3.2. Étude des caractères physiologiques

#### III.2.3.2.1. Influence de la température

La température est un paramètre important pour une croissance optimale, chaque microorganisme préfère des températures adéquates. L'influence de la température sur la croissance est testée en incubant les souches en milieux solides (gélose nutritive sur boîtes de Petri) à différentes températures: 30, 40, 50 et 60 °C pendant 48 h.

#### III.2.3.2.2. Influence de la salinité

L'halotolérance a été testée en étalant chaque culture sur des milieux liquides ou solides classiques auxquels on rajoute des concentrations différentes de NaCl: 1, 3, 5 et 7%. Le développement est vérifié après incubation aux températures optimales du microorganisme.

#### III.2.3.2.3. Influence du pH

L'influence du pH du milieu sur la croissance des souches est déterminée en l'ajustant à différentes valeurs, à savoir: 5, 7 et 9. Ensemencer 5 mL du bouillon nutritif au pH ajusté à 5, puis incuber à 50 °C.

### III.2.3.3. Étude biochimique

#### III.2.3.3.1. Étude du métabolisme énergétique

##### A. Test de catalase

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. L'apparition de bulles d'air et dégagement gazeux indique la présence de l'enzyme.

##### B. Test d'oxydase

Des disques d'oxydases prêts à l'emploi contenant du Dichlorure de N, Ndiméthyl-1,4-phénylènediammonium ont été utilisés. Une colonie bactérienne prélevée avec l'anse a été déposée sur le disque humecté d'une goutte d'eau distillée stérile. Les colonies qui virent au violet au bout de 30 secondes sont oxydase positive, et celles ne présentant aucun changement de couleur sont oxydase négative (Ulucay et *al.*, 2022).

##### C. Test Nitrate réductase

La nitrate réductase réduit les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) en Nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et chez certaines bactéries en azote ( $\text{N}_2$ ). Sa mise en évidence se fait par la réalisation d'une culture dans un bouillon nitraté. Incubé à 50 °C pendant 24-48 heures. Ajouter au moment de la lecture quelques gouttes des réactifs de Griess NR I (acide sulfanilique) et NR II ( $\alpha$  naphtylamine). En l'absence

de nitrites, rechercher la disparition des nitrates par addition de poudre de zinc qui va réduire les nitrates en nitrites (épreuve de zobell). Le virage immédiat de la couleur du jaune au rouge nous indique que la souche est nitrate réductase positive stade  $\text{NO}_2^-$ . Si le milieu reste inchangé (jaune), on ajoute alors de la poudre de Zinc. S'il devient rouge le test est négatif, s'il reste inchangé donc la souche est nitrate positif stade  $\text{N}_2$  (*In Bouacem, 2021*).

### II.2.3.3.2. Mise en évidence du métabolisme protéique

C'est l'étude de la capacité du microorganisme à dégrader des substances protéiques complexes tel que la gélatine, caséine ou d'autres protéines et acides aminés.

#### A. Hydrolyse de la gélatine

Un milieu à la gélatine est coulé en culot dans des tubes à essais, une fois solide, on ensemence par piqûres centrales et on incube à l'étuve, le milieu se liquéfie spontanément à température d'incubation, pour la lecture le tube doit être mis à 4 °C, la persistance de la liquéfaction traduit une protéolyse de la gélatine ( Guiraud and Galzy, 1980).

#### B. Production d'indole

L'indole il est produit par désamination et hydrolyse du tryptophane, sur milieu Fergusson (urée-indole); ou sur eau peptonnée exempte d'indole. L'indole est révélé par le réactif de Kovacs. Un tube est inoculé d'une colonie bactérienne puis incubé à 50°C pendant 24 heures. Quelques gouttes de réactif de Kovac sont ajoutées au milieu. L'apparition d'un anneau de couleur rouge vif en surface est considérée comme une réaction positive (Tsoetsi et al., 2020).

### III.2.3.3.3. Étude du métabolisme glucidique

#### A. Test du milieu Triple Sugar Iron

Pour mettre en évidence la fermentation des trois sucres (lactose, glucose et saccharose), nous avons procédé à l'ensemencement du culot par piqure centrale profonde et la pente par des stries serrées, puis incubé pendant 24h à 50°C. Si la bactérie fermente les trois sucres, on observe le jaunissement du milieu suite à son acidification (*In Bouacem, 2021*).

#### B. Test mannitol mobilité

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 en semi-solide Mannitol-mobilité puis incubé 24-48 h à 50°C. Acidification (virage au jaune): dégradation du mannitol. Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble (*In Bouacem, 2021*).

### III.2.3.3.4. Étude du métabolisme des acides organiques

#### III.2.3.3.4.1. Test de citrate

Des géloses inclinées au citrate de Simmons sur des tubes à essai ont été inoculées avec des isolats bactériens et incubées pendant 24 heures à 50°C. Un changement de couleur du vert au bleu était une indication d'une réaction positive (Tsotetsi et *al.*, 2020).

#### III.2.3.3.5. Recherche du type respiratoire

La détermination du type respiratoire est réalisée sur la gélose viande foie, après sa régénération au bain-marie à 100 °C pendant 20 minutes, suivie d'un abaissement de la température à 50 °C. Les tubes à essais contenant 20 mL de milieu gélosé sont maintenus en surfusion entre 45-50 °C afin d'éliminer toute trace d'oxygène. Ces tubes à essais stériles sont ensuite inoculés à l'aide d'une pipette boutonnée, par piqûre centrale profonde, la pipette est retirée tout en décrivant des tours de spires. Les tubes sont immédiatement refroidis et incubés à une température de 50 °C pendant 24 heures (*In Bouacem*, 2021).

#### III.2.3.3.6. Dégradation de l'urée

L'uréase transforme l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium. Cette réaction se traduit par une alcalinisation du milieu liquide de Fergusson (urée - indole) ce milieu vire au rouge si l'urée est dégradée ( Guiraud and Galzy, 1980).

#### III.2.3.3.7. Test Ortho-Nitro-Phenyl Galactopyranoside

C'est la recherche de la présence de l'enzyme du métabolisme du lactose, la bêta-galactosidase, une enzyme capable de dégrader toute molécule analogue à l'ONPG. La dégradation du lactose passe par sa transformation en glucose et galactose grâce à deux enzymes, le lactose perméase qui permet le passage du lactose par la membrane plasmique et la  $\beta$ -galactosidase qui catalyse son hydrolyse en glucose et galactose. Réaliser une suspension bactérienne à partir d'un milieu solide dans de l'eau physiologique, ajouter un disque imprégné d'ONPG et incubé à 50 °C. L'apparition d'une coloration jaune indique ONPG (+) et  $\beta$ -galactosidase (+), si la suspension reste incolore donc la souche est dite ONPG (-) et  $\beta$ -galactosidase (-) (*In Bouacem*, 2021).

### III.2.3.4. Mise en évidence de l'activité hydrolytiques extracellulaires

Des tests d'activité enzymatique sur des milieux additionnés de substrats enzymatiques ont été effectués. La recherche d'hydrolases extracellulaires est réalisée sur milieu solide. Les boîtes de Petriensemencées sont incubées à 50 °C pendant 24 - 48 heures.

#### III.2.3.4.1. Caséinases

Ce test permet la mise en évidence de l'hydrolyse de la caséine sur agar doublement concentré additionné de lait écrémé. La présence d'une activité caséinolytique se manifeste

par la présence d'un halo clair autour des colonies suite à l'hydrolyse de ce polymère (*In Bouacem, 2021*).

### III.2.3.4.2. Chitinases

Pour mettre en évidence l'activité chitinolytique, 0,2 % (v/v) de chitine colloïdale sont incorporées dans la gélose nutritive. Après incubation, la production de l'enzyme se manifeste par des zones d'hydrolyses claires autour des colonies (*In Bouacem, 2021*).

### III.2.3.4.3. Activité lipolytique

#### III.2.3.4.3.1. Estérases

Elle est mise en évidence par le test d'hydrolyse des Tween 20 et 80. Qui sont ajoutés à une concentration de 1% (v/v) au milieu de base stérile en surfusion contenant 0,01% de CaCl<sub>2</sub>. Une lecture positive est traduite par l'apparition des cristaux autour des colonies productrices d'estérase (*In Bouacem, 2021*).

#### III.2.3.4.3.2. Lipases

Le test d'hydrolyse de l'huile d'olive permet la recherche de la lipase. L'activité lipasique est détectée sur un milieu de culture solide (gélose nutritive) additionnée d'huile d'olive stérile (par filtration sous vide) et d'une solution fluorescente de Rhodamine B. Un halo orange clair fluorescent apparaît autour des colonies produisant des lipases, placées sous UV à 350 nm (*In Bouacem, 2021*).

#### III.2.3.4.4. Cellulases

L'activité de la cellulase est évaluée par l'ajout de 0,5% (p/v) de carboxyméthyl cellulose (CMC) dans la gélose nutritive. Après incubation, les boîtes de Petri sont inondées par une solution de rouge Congo à 0,1% (p/v) et incubées pendant 15 à 30 minutes. On peut aussi remplacer la solution de rouge Congo par une solution de NaCl à 1M et les boîtes sont laissées pendant 5 à 10 minutes à température ambiante. La production de cellulase est appréciée par l'apparition de zones claires autour des colonies (*In Bouacem, 2021*).

#### III.2.3.4.5. Lécithinases

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 la détermination de l'enzyme lécithinase. On utilise le milieu 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 a révélé 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 Lécithinase.

- Un halo d'éclaircissement autour de la colonie indique la présence d'une lipoprotéinase. La recherche de cette enzyme exige une lecture précoce.
- La présence de la lipase donne une zone floue autour de la colonie (*In* Bouacem, 2021).

### III.2.3.4.6. Amylases

L'activité amylolytique est mise en évidence en cultivant les souches bactériennes souhaitées sur gélose nutritive contenant 1% d'amidon soluble. Les boîtes sont incubées à 50°C pendant 24 à 48h. Après incubation, le milieu gélosé est recouvert d'une solution de Lugol pendant 30 secondes puis un rinçage à l'eau distillée. L'apparition d'une zone claire autour des colonies indique la présence d'une activité amylolytique. Un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture (Benkahoul et *al.*, 2017).

# *Résultats et Discussion*

### I. Résultats de l'analyse physicochimique

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

L' eau est de couleur transparente et elle n'a aucune odeur caractéristique.

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

Le tableau VII présente les résultats des paramètres physico-chimiques.

**Tableau VII:** Résultats de la mesure de la T, pH, turbidité, l'oxygène dissout, conductivité et résidus sec de l'eau thermale Hammam Essalihine

Paramètres	T°C	pH	Turbidité (NTU)	Oxygène dissous (mg/L)	Conductivité ( $\mu\text{S/cm}$ ) à 28.8 C	Résidus secs (mg/L)
Résultats	45	8.2	5,46	00	282	400

Il est primordial de connaître la température d'une eau. En effet elle joue un rôle très important dans la solubilité des sels et surtout des gaz (Ould Cheikh et *al.*, 2012). La température de la source thermale étudiée est de 45 °C, elle est considérée comme mésothermale (Bouacem, 2016).

Le pH son rôle est essentiel pour la croissance des microorganismes. Lorsque le pH est inférieur à 5 ou supérieur à 8,5, la croissance des microorganismes est directement affectée (Belghyti et *al.*, 2010). D'après les résultats indiqués dans le tableau ci-dessus, le pH de notre eau s'est avéré alcalin.

D'après les résultats obtenus dans le tableau VII, on note une turbidité de 5,46 NTU. On a constaté que cette eau est pauvre en matières en suspension.

La mesure de l'oxygène dissout devrait se faire in situ, car l'oxygène initialement contenu est consommé complètement par les microorganismes présents dans cet échantillon ce qui explique le résultat obtenu dans le tableau VII. Amarouche-Yala et *al.* (2015), dans leur étude ils ont constaté que certaines sources hyperthermales algériennes présentaient une concentration en oxygène dissout plus faible par rapport aux sources mésothermales qui présentaient une concentration élevée en oxygène dissout ainsi qu'un nombre total de bactéries viables. En effet, plus la température est élevée plus la concentration d'oxygène dissout diminue.

Un taux de salinité élevée dans les eaux provoque une augmentation de la conductivité (Ould Cheikh et *al.*, 2012). D'après les résultats du tableau VII, on note une conductivité de 282  $\mu\text{S/cm}$ .

La teneur de l'eau en résidus secs, nous informe sur la minéralité (Bouacem, 2016). D'après les résultats du tableau VII, on note une teneur de l'eau en résidus secs de 400 mg/L.

### I.3. Résultats de l'alcalinité de l'eau

#### I.3.1. Titre alcalimétrique

Le tableau VIII donne le résultat en mmol/L et en °F du titre alcalimétrique (TA). Sachant que  $1\text{mmol} = 5^\circ\text{F}$ .

**Tableau VIII:** Résultat du titre alcalimétrique.

Résultats		TA	
		mmol/L	°F
		1	5
V <sub>1</sub> (Hcl)	1mL		
V (ech)	100mL		
C (Hcl)	0.1M		

D'après les résultats du tableau VIII la valeur du TA obtenue est de 5 °F.

#### I.3.2. Titre alcalimétrique complet

Le tableau IX donne le résultat du titre alcalimétrique complet (TAC).

**Tableau IX:** Résultat du titre alcalimétrique complet.

Résultats		TAC	
		mmol/L	°F
		3	15
V <sub>1</sub> (Hcl)	3mL		
V (ech)	100mL		
C(Hcl)	0.1M		

D'après les résultats du tableau ci-dessus la valeur du TAC obtenue est de 15 °F.

### I.4. Résultats de la détermination de la dureté calcique

Le tableau X donne le résultat de la dureté calcique

**Tableau X:** Résultat de la dureté calcique.

Résultats		[Ca <sup>2+</sup> ]
		mmol/L
		0.96
V(EDTA)	4.8mL	
C(EDTA)	0.01mol	
V (ech)	50mL	

### I.4.1. Résultats de la détermination de la dureté du $Mg^{2+}$

Le dosage du magnésium est donné dans le tableau XI.

**Tableau XI:** Résultat de la dureté du  $Mg^{2+}$ .

Résultats		[Mg <sup>2+</sup> ]
		mmol/L
		0.44
TH	1.4	
TH calcique	0.96	

Le  $Ca^{2+}$  et le  $Mg^{2+}$  sont présents dans l'eau thermale en quantité moindre avec respectivement 0,96 mmol/L et 0,44 mmol/L.

### I.4.2. Résultats de la détermination de la dureté totale

Le tableau XII donne le résultat du titrage de la TH

**Tableau XII:** Résultat de la dureté totale (TH).

Résultats		TH	
		mmol/L	°F
		1.4	7
V(EDTA)	7mL		
C(EDTA)	0.01mol		
V (éch)	50mL		

D'après les résultats du tableau ci-dessus la valeur de la dureté totale obtenue est de 7 °F.

### I.5. Résultat de la recherche des ions et des métaux lourds

Les résultats de la recherche des ions et des métaux lourds sont représentés dans le tableau XIII.

**Tableau XIII:** Mise en évidence de la présence ou absence de certains ions dans la source thermale étudiée.

Ions	Al	Cu	Fe	K	Ca	Cd	Cr	Mn	Ni	Zn	Mg	Na	NH <sub>4</sub>
Résultat	Abs	Abs.	Abs.	Abs.	Trace	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.	Trace	Abs	Trace

Abs: Absence.

La plupart des éléments chimiques dosés sont absents dans cette eau, probablement que l'eau lors de sa remontée à la surface, a concédé certains ions aux roches. L'absence de métaux

lourds dans la source thermale prouve que cette eau se trouve dans un milieu propre qui n'est pas pollué.

## II. Résultats de la microbiologie des eaux

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

Le tableau suivant résume l'ensemble des résultats de la qualité sanitaire des eaux thermales.

**Tableau XIV:** Résultats du contrôle de la qualité sanitaire.

Paramètres	Lectures et interprétations	Résultats
<b>Flore mésophile aérobie totale (FAMT)</b>	Les trois dilutions sont positives, il y'a eu de la culture sur les trois boites, où N est supérieur à 300 colonies.	Indénombrables
<b>Coliformes totaux (CT) et fécaux (CF)</b>	Y'a pas eu de virage de couleur du milieu vers le jaune, donc pas d'acidification et la cloche ne renferme pas de gaz. L'échantillon n'est pas contaminé par les coliformes totaux et fécaux : Absence d' <i>E. coli</i> dans notre échantillon.	Absence
<i>Streptocoques fécaux</i>	Absence du trouble dans le milieu. Absence de <i>Streptocoques fécaux</i> dans cette eau.	Absence
<i>Staphylococcus aureus</i>	Le Bouillon Giolitti Cantoni (GC) ne présente aucun noircissement après 48h d'incubation. Un isolement de précaution a été effectué sur milieu Chapman aucune colonie jaune doré. Cette eau ne contient pas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	Absence
<i>Clostridium sulfito réducteurs</i>	Aucun des quatre tubes ne présente une colonie noire. Cette eau ne contient pas <i>Clostridium sulfito réducteur</i> .	Absence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sur gélose au Cétrimide, il y'a eu aucun développement, les tubes de BCPL étaient aussi négatifs.	Absence

La qualité sanitaire de l'eau de source thermale étudiée est de très bonne qualité. Absence totale de germes pathogènes, donc cette eau pourrait être utilisée à des fins thérapeutiques.

## II.2. Etude morphologique

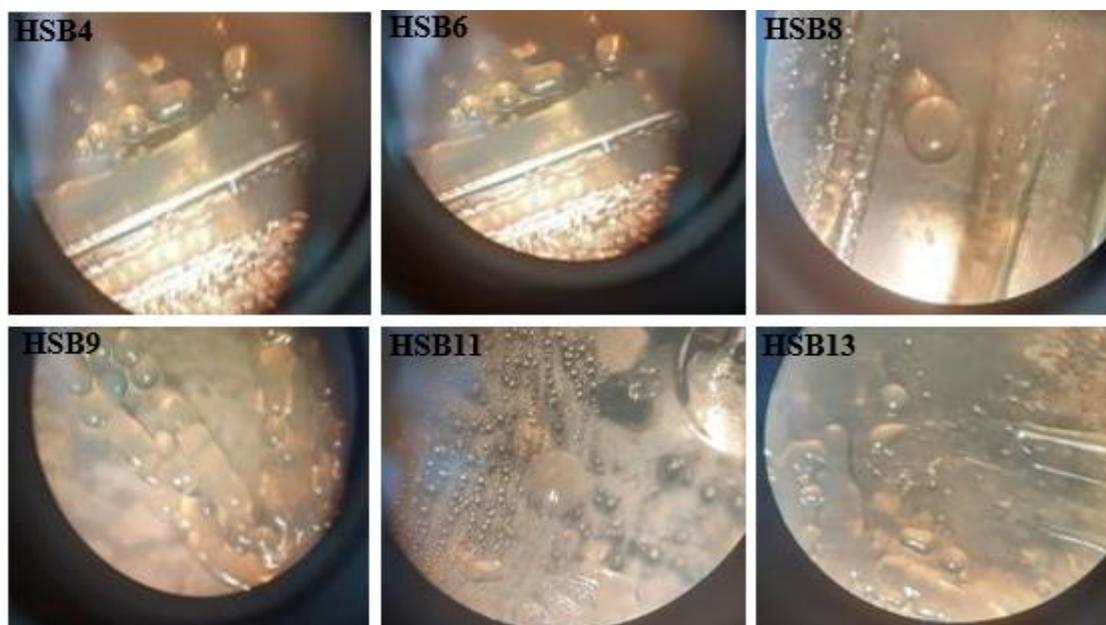
### II.2.1. Examen macroscopique

Une culture chargée de colonies de tailles, de forme et de consistance variables a poussé sur les milieux gélosés: GN, M1, M2 et nitrate, trois purifications successives ont été effectuées et nous ont permis d'isoler 13 souches bactériennes d'aspects macroscopiques et microscopiques diversifiés, le tableau XV regroupe les caractéristiques macroscopiques des souches bactériennes isolées.

**Tableau XV:** Caractères macroscopiques observés chez les souches isolées.

Aspect Souche	Forme	Taille	Contour	Couleur	Élévation	Opacité	Aspect de surface
<b>HSB1</b>	Ronde	Moyenne	Régulier	Blanche	Bombé	Transparente	Lisse
<b>HSB2</b>	Ronde	Moyenne	Régulier	Blanche	Bombé	Transparente	Lisse
<b>HSB3</b>	Ronde	Moyenne	Régulier	Jaunâtre	Bombé	Translucide	Lisse
<b>HSB4</b>	Ronde	Très Petite	Régulier	Jaunâtre	Bombé	Transparente	Lisse
<b>HSB5</b>	Ronde	Grande	Régulier	Verte	Plate	Opaque	Lisse
<b>HSB6</b>	Ronde	Petite	Régulier	Jaunâtre	Bombé	Opaque	Lisse
<b>HSB7</b>	Ronde	Grande	Régulier	Blanche	Plate	Opaque	Lisse
<b>HSB8</b>	Ronde	Grande	Régulier	Blanche	Bombé	Opaque	Lisse
<b>HSB9</b>	Ronde	Petite	Régulier	Blanche	Bombé	Opaque	Lisse
<b>HSB10</b>	Ronde	Grande	Irrégulier	Blanche	Plate	Opaque	Lisse
<b>HSB11</b>	Ronde	Grande	Régulier	Jaunâtre	Bombé	Opaque	Lisse
<b>HSB12</b>	Ronde	Très petite	Régulier	Blanche	Plate	Opaque	Lisse
<b>HSB13</b>	Ronde	Petite	Régulier	Incolore	Bombé	Translucide	Lisse

La figure (11) montre l'aspect macroscopique des colonies spécifiques de quelques souches isolées observées à la loupe binoculaire au grossissement GX20.



**Figure 11:** Aspect macroscopique des colonies isolées sur GN au GX 20.

### II.2.2. Examen microscopique

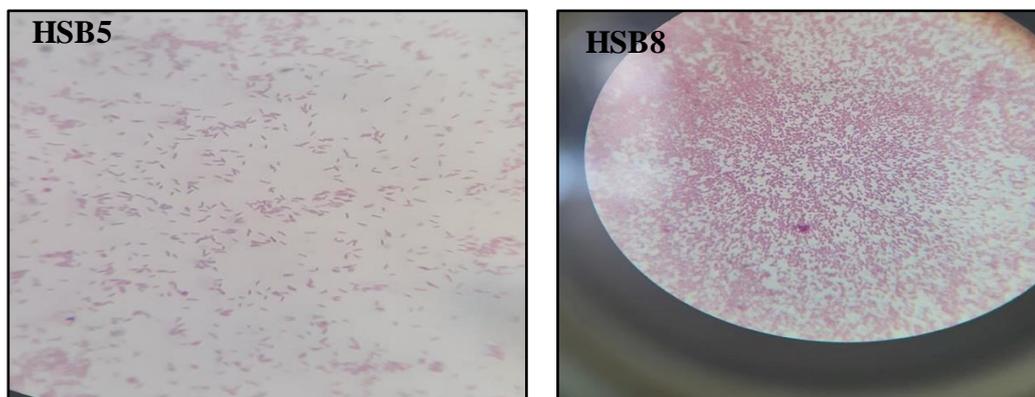
L'observation à l'état frais des souches bactériennes au microscope photonique au grossissement (G×40) nous a permis de constater les caractéristiques des souches illustrées dans le tableau XVI.

Sur la base de la coloration de Gram, plus de la moitié des souches se sont avérées Gram négatifs, notamment les souches HSB1, HSB2, HSB4, HSB6, HSB8, HSB9 et HSB12.

**Tableau XVI:** Résultats de l'ensemble des caractéristiques morphologiques observées à l'état frais et fixé.

Caractère Souches	Etat frais				Etat fixé
	Forme	Le monde d'arrangement	Mobilité	Spore	Gram
<b>HSB1</b>	Bacille	Isolé	Oui	Non	Négatif
<b>HSB2</b>	Bacilles	Diplobacilles	Oui	Non	Négatif
<b>HSB3</b>	Bacille	Isolé	Oui	Non	Positif
<b>HSB4</b>	Bacille	Isolé	Oui	Non	Négatif
<b>HSB5</b>	Coccobacille	Isolé	Oui	Non	Positif
<b>HSB6</b>	Streptobacille	En chaînette	Oui	Non	Négatif
<b>HSB7</b>	Streptobacille	En chaînette	Oui	Non	Positif
<b>HSB8</b>	Bacille	Isolé	Oui	Non	Positif
<b>HSB9</b>	Bacille	Isolé	Oui	Non	Négatif
<b>HSB10</b>	Bacille	Isolé	Oui	Oui	Positif
<b>HSB11</b>	Bacille	Isolé	Oui	Non	Positif
<b>HSB12</b>	Bacille	Isolé	Oui	Non	Négatif
<b>HSB13</b>	Bacille	En chaînette	Oui	Non	Positif

Les illustrations suivantes montrent quelques Grams observés aux GX1000.



**Figure 12:** Observation du Gram au GX1000.

Cette limitation en diversité microbienne est expliquée par les méthodes d'isolement utilisées, appropriées uniquement aux bactéries thermophiles. Dans la présente étude nous n'avons pas ciblé d'autres microorganismes thermophiles, tels que les archées. Du fait qu'elle nécessite des conditions de culture rigoureuses et des méthodes de cultures irréalisables. En effet, elles sont les plus répandues dans les milieux extrêmes. En d'autres conditions d'isolement, la prévalence des archées est communément très importante dans les eaux thermales, elles sont beaucoup plus répandues à tendance dominante dans ce genre de milieu extrême. Dans la présente étude, nous avons utilisé une approche dépendante de la culture, la recherche et l'isolement de souches microbienne a été effectuée par la méthode traditionnelle; cependant,

la méthode dépendante de la culture présente plusieurs inconvénients. En effet la plupart des microorganismes restent dissimulés ou difficilement cultivables.

Narsing Rao et *al.* (2021) apportent dans leur étude que les résultats de l'analyse de la diversité microbienne issue d'une culture et celle indépendante de la culture ne présentaient pas la même composition microbienne. Dans l'analyse dépendante de la culture, les *Firmicutes* étaient dominantes, suivies des *Proteobacteria*, tandis que dans l'analyse indépendante de la culture, les *Proteobacteria* étaient dominantes, suivies des *Firmicutes*. Il apporte aussi que la richesse microbienne a diminué avec l'augmentation de la température. L'analyse indépendante de la culture a permis d'obtenir des isolats variés. Ainsi que les sources chaudes étudiées abritaient plusieurs embranchements bactériens. Tandis que seulement quatre embranchements bactériens ont été récupérés à l'aide d'une analyse dépendante de la culture. Nous avons conclu et confirmé, *via* cette étude, que les méthodes de cultures et d'isolements usuelles de laboratoire utilisées sont limitées et peu performantes pour un isolement exhaustif des thermophiles.

Nous avons réussi à isoler seulement treize souches et cela reste relativement faible comparativement à l'observation microscopique de l'état frais de l'échantillon qui a révélé, une diversité considérable. Des formes bacillaires plus au moins longues ou très longues, parfois épaisses et le plus souvent fines, avec une mobilité très importante. Des formes coccoïdes de taille et de mobilité variées. Le nombre d'isolats obtenus est considéré comme faible et cela est fort probablement dû:

- À la température d'incubation ciblée qui est de 50 °C. Si on avait travaillé à une température plus basse la diversité serait plus importante. En effet, plus la température augmente plus la diversité microbienne diminue.
- Au type de milieu d'isolement utilisé. Si on avait varié davantage la composition des milieux ainsi que les conditions d'aérobiose, on aurait obtenu une plus grande diversité de souches.

### II.3. Caractérisation physiologique des souches

Les résultats de la caractérisation physiologique des différentes souches sont rassemblés dans le tableau XVII.

#### II.3.1. Influence de la température sur la croissance

Toutes les souches étudiées poussent à 30, 40 et 50 °C. Pour la majorité des souches la croissance est réduite à 60°C. Près de la moitié n'ont pas poussé à 60 °C, notamment la HSB3, HSB5, HSB6, HSB7, HSB8 et HSB13. Le nombre de souches qui ont poussé aux différentes températures testées est donné dans le tableau XVII.

### II.3.2. Influence de la salinité sur la croissance

Le nombre de souches en croissance est légèrement réduit avec l'augmentation de la concentration en sel dans le milieu. Les souches HSB9 et HSB13 n'ont pas poussé à 1 % de NaCl (p/v). Les mêmes souches citées précédemment n'ont pas poussé aussi à 3 % de NaCl (p/v). Toutes les souches isolées poussent bien à 7 % de NaCl à l'exception des souches HSB1, HSB5 et HSB10.

### II.3.3. Influence du pH sur la croissance

Toutes les souches se sont avérées capables de se développer à pH neutre (pH = 7). À un pH alcalin (pH = 9), près de la moitié des souches sont capables de croître, notamment les souches HSB1, HSB5, HSB7, HSB8, HSB10, HSB12. Au pH acide (pH = 5) aucune des treize souches n'a poussé. Notre eau est légèrement alcaline avec un pH de 8,2 et près de la moitié des souches ont poussé à un pH de 9 et aucune n'a connu un développement au pH =5. On constate que majoritairement, que nos souches sont des alcalinophiles.

**Tableau XVII:** Résultats de l'influence de la température, la salinité et le pH sur la croissance.

Paramètre Souches	Température °C				NaCl				pH		
	T 30	T 40	T 50	T 60	NaCl 1%	NaCl 3%	NaCl 5%	NaCl 7%	pH 5	pH 7	pH 9
<b>HSB1</b>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
<b>HSB2</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<b>HSB3</b>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
<b>HSB4</b>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
<b>HSB5</b>	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
<b>HSB6</b>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
<b>HSB7</b>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<b>HSB8</b>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<b>HSB9</b>	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
<b>HSB10</b>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
<b>HSB11</b>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
<b>HSB12</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<b>HSB13</b>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-

(+) Croissance. (-) Pas de croissance.

### II.4. Résultat de l'étude biochimique des souches isolées

Après avoirensemencé une galerie biochimique composée de 9 caractères les résultats ont montré une grande variabilité métabolique sur les 13 souches isolées. Le tableau XVIII regroupe les résultats de l'étude biochimique.

### **II.4.1. Métabolisme énergétique**

L'étude du métabolisme énergétique permet la mise en évidence de la présence ou de l'absence des enzymes respiratoire chez les 13 souches étudiées. Les résultats obtenus montrent que toutes les souches bactériennes étudiées ont au moins une enzyme respiratoire requise (catalase, oxydase, nitrate réductase).

### **II.4.2. Métabolisme protéique**

#### **II.4.2.1. Hydrolyse de la gélatine**

Seulement deux souches isolées, la HSB5 et HSB12 qui possèdent une gélatinase.

#### **II.4.2.2. Production d'indole**

Les résultats obtenus nous ont permis de constater qu'aucune souche ne produit de l'indole.

### **II.4.3. Métabolisme glucidique**

#### **II.4.3.1. TSI agar**

Les résultats obtenus sur ce milieu nous ont permis de constater qu'aucune des 13 souches ne fermente les 3 sucres et aucune souche ne produit le sulfure d'hydrogène et il n'y'a que la HSB12 qui est gazogène.

#### **II.4.3.2. Test Mannitol-Mobilité**

Les résultats obtenus concernant ce test nous ont permis de déduire que les 13 souches sont mobiles et que y'a que deux souches qui dégradent le mannitol notamment les souches HSB6 et HSB10.

### **II.4.4. Métabolisme des acides organiques**

#### **II.4.4.1. Test de citrate**

Nous avons constaté que seule 2 souches le sont: la HSB5 et la HSB12. En effet, le virage du milieu au bleu indique une alcalinisation du milieu donc le citrate est utilisé par la souche comme seule et unique source de carbone et témoigne de la présence de l'enzyme.

### **II.4.5. Recherche du type respiratoire**

Les résultats illustrés dans le tableau XVIII nous ont permis de déduire que la majorité des souches étudiées sont aérobies facultatif.

### II.4.6. Dégradation de l'urée

La souche HSB10 est la seule et unique souche munie d'une uréase. Le reste des souches sont incapables de transformer l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium.

### II.4.7. Test Ortho-Nitro-Phenyl Galactopyranoside

Les résultats obtenus nous ont permis de constater que les six souches: HSB2., HSB3, HSB4, HSB8, HSB9 et HSB13 sont dotées d'une  $\beta$ -galactosidase.

Tableau XVIII: Résultats de la galerie biochimique des souches recherchées.

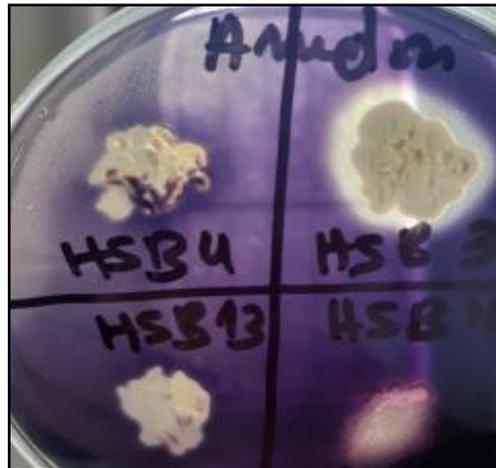
Caractère Souches	Oxy	Cat	Urée	Ind	Métabolisme glucidique		Mannitol-Mobilité		TSI					NR	ONPG	Cit	Gél	Viande foie
					RM	VP	Manit	Mob	Glu	Sacch	Lac	H <sub>2</sub> S	Gaz					
HSB1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+(N <sub>2</sub> )	-	-	-	AAF
HSB2	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+(N <sub>2</sub> )	+	-	-	AAF
HSB3	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+(N <sub>2</sub> )	+	-	-	AAF
HSB4	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+(N <sub>2</sub> )	+	-	-	AAF
HSB5	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+(N <sub>2</sub> )	-	+	+	A
HSB6	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+(N <sub>2</sub> )	-	-	-	A
HSB7	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+(N <sub>2</sub> )	-	-	-	AS
HSB8	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	AAF
HSB9	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	A
HSB10	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+(N <sub>2</sub> )	-	-	-	A
HSB11	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+(N <sub>2</sub> )	-	-	-	AS
HSB12	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+(N <sub>2</sub> )	-	+	+	AS
HSB13	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+(N <sub>2</sub> )	+	-	-	A

(+)Présence. (-) Absence

Les résultats ci-dessus montrent bien que les souches étudiées présentent une diversité métabolique très importante ce qui témoigne qu'elles appartiennent à des taxons différents.

### II.5. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

Les 13 souches ont été criblées pour l'activité enzymatique afin de révéler leur capacité à produire des enzymes hydrolytiques extracellulaires thermostables, notamment l'amylase, la cellulase, la caséinase, la chitinase, l'estérase, la lécithinase, la lipase et la lipoprotéinase. Tous les isolats étaient capables de produire plus de 3 enzymes étudiées. Les résultats ont révélé que 6 souches bactériennes avaient une capacité de production de l'amylase, cela signifie que près de la moitié des souches possèdent une activité amylolytique. La souche HSB3 présente l'activité la plus importante.



**Figure 13:** Activité amylolytique de certaines souches isolées.

La caséinase est présente chez toutes les souches étudiées, à l'exception de la souche HSB6.



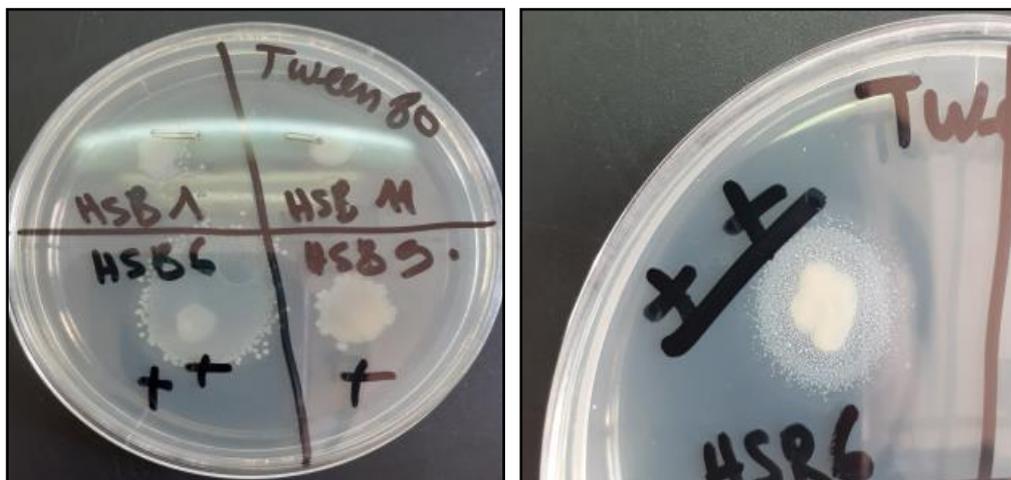
**Figure 14:** Activité de la caséinase sur les protéines du lait après 48h.

Toutes les souches étudiées possèdent une activité cellulasique.



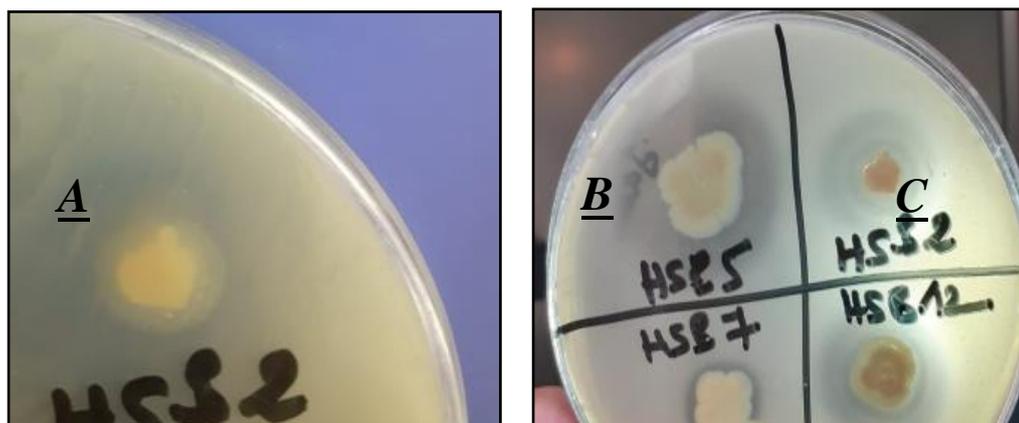
**Figure 15:** Zone claire autour de la colonie dotée d'une cellulase.

Tous les isolats sont estérase positive sur le tween 20 à l'exception des 3 souches: HSB7, HSB10, HSB12, qui sont dépourvues de cette enzyme. Quant aux estérases sur le tween 80 nous avons eu uniquement les souches HSB9 et HSB6 qui possèdent cette enzyme. La figure 16 montre le dépôt du  $\text{CaCl}_2$  autour des colonies estérase positive.



**Figure 16:** Dépôt du  $\text{CaCl}_2$  autour des colonies dotées d'une estérase au Tween 20 et Tween80.

La majorité des souches étudiées ne produisent pas la lécithinase, la présence de cette enzyme est constatée uniquement chez 4 souches notamment, HSB5, HSB6, HSB10 et HSB12. Plus de la moitié des souches étudiées sécrètent une lipoprotéinase, cette enzyme est fortement sécrétée chez la souche HSB5.



**Figure 17:** Mise en évidence des enzymes sur milieu à émulsion de jaune d'œuf. (A). Lipase, (B). Lécithinase, (C). Lipoprotéinase.

L'activité chitinolytique est absente chez la totalité des souches, aucune souche ne produit de la chitinase. Et cela est traduit par l'absence de zones claires autour des colonies.

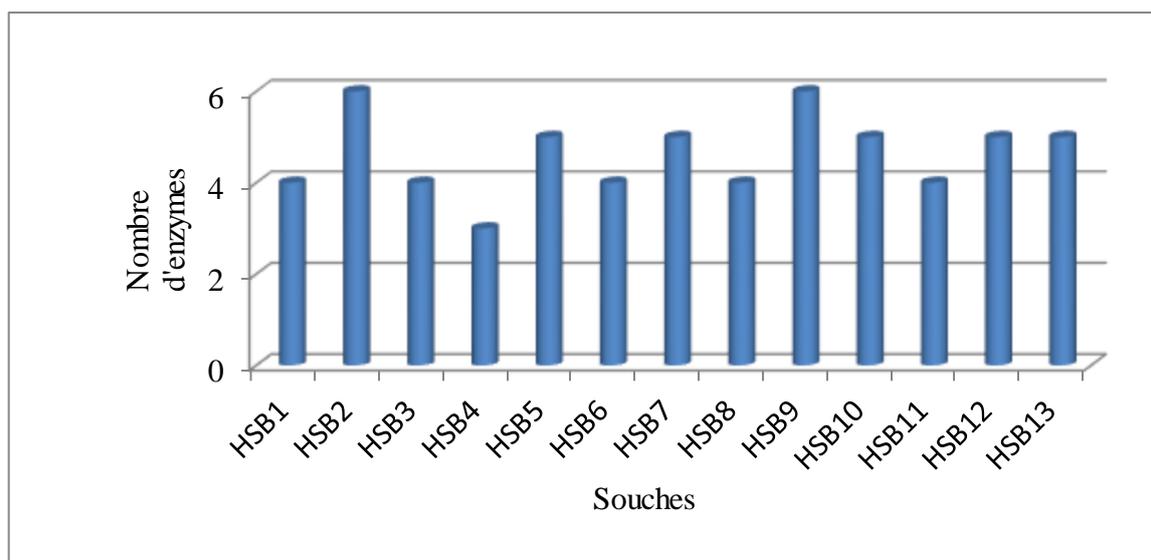
Nos résultats montrent que la majorité des isolats présentent des enzymes extracellulaires thermostables. Cet arsenal enzymatique important est dû à la pauvreté du milieu. La bactérie s'adapte pour dégrader les substrats complexes comme la chitine, la caséine, la kératine pour assurer sa survie. Le diamètre de la zone d'hydrolyse ne représente pas toujours la quantité d'enzymes produite. En fait, la quantité d'enzymes produite dépend de plusieurs facteurs, tels que: La concentration en enzyme synthétique, la taille de l'enzyme, la concentration en gélose et d'autres paramètres physico-chimiques (Allala, 2020).

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

Tableau XIX: Résultats des activités enzymatiques recherchées.

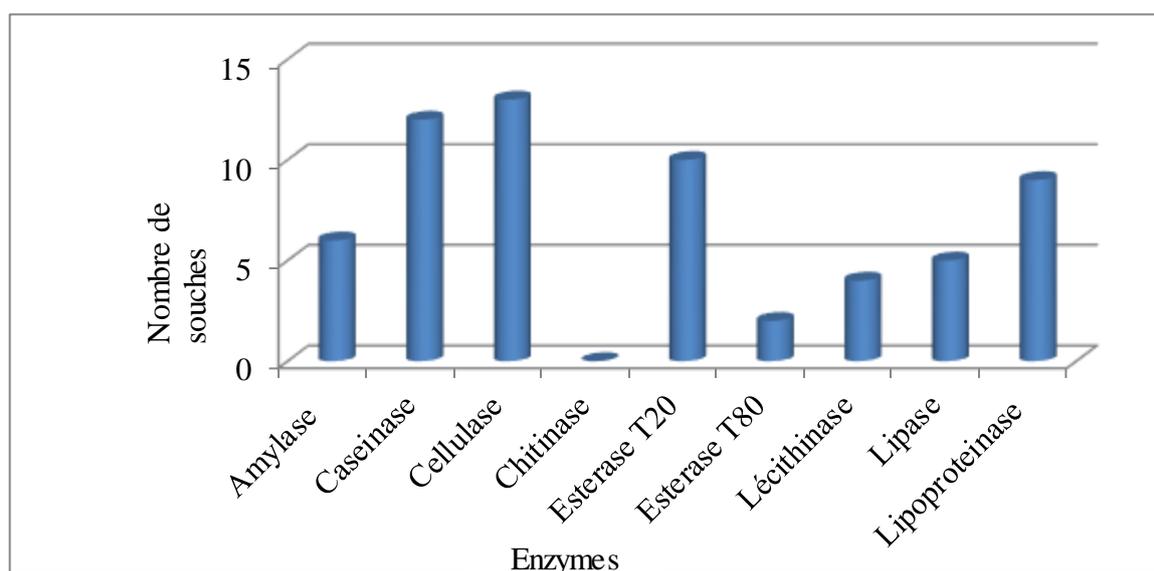
Enzyme Souche	Amylase	Caséinase	Cellulase	Chitinase	Estérase		Lécithinase	Lipase	Lipoprotéase
<b>HSB1</b>	-	+	+	-	+	-	-	-	+
<b>HSB2</b>	+	+++	++++	-	+	-	-	+	++
<b>HSB3</b>	++	++	++++	-	++	-	-	-	-
<b>HSB4</b>	-	+++	+	-	+	-	-	-	-
<b>HSB5</b>	+	+++++	++++	-	+	-	+	-	+++
<b>HSB6</b>	-	-	+	-	+++	++	+	-	-
<b>HSB7</b>	+	++++	+	-	-	-	-	+	+
<b>HSB8</b>	-	+++	+	-	+++	-	-	-	+
<b>HSB9</b>	-	++	++	-	++	+	-	+	+
<b>HSB10</b>	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<b>HSB11</b>	-	+	+	-	++	-	-	-	+
<b>HSB12</b>	+	++++	+	-	-	-	+	-	+
<b>HSB13</b>	-	+++	+	-	++	-	-	+	+

(+)Présence. (-) Absence.



**Figure 18:** Étude quantitative de la capacité de chaque souche isolée à produire des enzymes.

Par cette représentation graphique on peut déduire que toutes les souches contiennent au moins 3 différents types d'enzymes thermorésistantes. La souche HSB4 est la moins performante en termes de variation d'activités enzymatiques sur la gamme d'enzymes testées et cela avec uniquement 3 types d'enzymes distinctes.



**Figure 19:** Étude du type d'enzyme sécrétée par les isolats.

Sur ce graphique, on constate que 6 souches sont capables de sécréter de l'amylase, 12 souches sur 13 ont une caséinase, toutes les souches sont dotées d'une cellulase, l'activité de l'estérase de ces isolats sur le tween 20 est beaucoup plus importante que sur le tween 80 avec 10 souches contre uniquement 2, respectivement. Neuf souches sont capables de sécréter les lipoprotéinases. Quatre souches ont une lécithinase. La chitinase est complètement absente chez toutes les espèces isolées.

# *Conclusion et perspectives*

Les enzymes thermostables ont connu de nombreuses utilisations dans les processus industriels, tel que la production et la transformation des aliments, dans l'industrie textile, la production de papier et des biocarburants.

Le but de notre étude était d'explorer un environnement extrême (source thermale) et d'isoler des souches bactériennes thermophiles ou hyperthermophiles productrices de substances bioactives à des fins biotechnologiques. Notre choix s'est posé sur la source thermale algérienne, Hammam Essalihine de la wilaya de Bejaïa. Le choix de ce site d'étude n'est pas fortuit, car il est considéré comme un environnement chaud très prometteur en termes de biodiversité microbienne et éventuellement de bioressources en molécules enzymatiques thermostables très recherchées. En plus d'être un écosystème potentiel pour l'isolement de souches nouvelles et intéressantes, il est encore une mine de souches microbiennes peu ou pas encore étudiée.

Nous sommes parvenus par notre étude à isoler treize souches thermophiles à une température de 50 °C. Les isolats obtenus ont un panel très intéressant d'enzymes extracellulaires thermostables tels que, l'amylase, la cellulase, la caséinase, la chitinase, l'estérase, la lécithinase, la lipase et la lipoprotéase. Ces souches sont dotées de capacités de croître à des températures élevées, dans des gammes de salinités variables et à un pH optimal alcalin.

Les isolats issus de notre étude pourraient servir prochainement dans des applications industrielles, comme pour nettoyer les taches de gras difficiles et persistantes, grâce à l'activité de la lipoprotéase, et de la lipase sur le linge. Et cela après l'optimisation de sa production ainsi que sa purification, et sa mise au marché sous une forme commerciale.

D'autres études complémentaires sont nécessaires pour cerner les propriétés de ces bactéries ainsi que leur biomolécule tel que l'identification moléculaire, purification et caractérisation des enzymes.

*Références  
bibliographiques*

### A

**Adalsteinsson, B. T., Kristjansdottir, T., Merre, W., Helleux, A., Dusaucy, J., Tourigny, M., Fridjonsson, O., & Hreggvidsson, G. O. (2021).** Efficient genome editing of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*, using a thermostable Cas9 variant. *Scientific Reports*, 11(1), 9586. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89029-2>

**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. <https://doi.org/10.1007/s12517-019-4945-4>

**Ajeje, S. B., Hu, Y., Song, G., Peter, S. B., Afful, R. G., Sun, F., Asadollahi, M. A., Amiri, H., Abdulkhani, A., & Sun, H. (2021).** Thermostable cellulases / xylanases from thermophilic and hyperthermophilic microorganisms: current perspective. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 794304. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.794304>

**Algan, M., Sürmeli, Y., & Şanlı Mohamed, G. (2021).** A novel thermostable xylanase from *Geobacillus vulcani* GS90: Production, biochemical characterization, and its comparative application in fruit juice enrichment. *Journal of Food Biochemistry*, 45(5). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13716>

**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. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i1.31>

**Allala, F. (2020).** Caractérisation d'enzymes thermostables produites par des souches bactériennes d'origine hydrothermale. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene. 144.

**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. <https://doi.org/10.1007/s12403-014-0130-x>

**Asgher, M., Urooj, Y., Qamar, S. A., & Khalid, N. (2020).** Improved exopolysaccharide production from *Bacillus licheniformis* MS3: Optimization and structural/functional characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 984-992. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.094>

**Atanasova, N., Paunova-Krasteva, T., Stoitsova, S., Radchenkova, N., Boyadzhieva, I., Petrov, K., & Kambourova, M. (2021).** Degradation of Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) by a Thermophilic Community and *Brevibacillus thermoruber* Strain 7 Isolated from Bulgarian Hot Spring. *Biomolecules*, 11(10), 1488. <https://doi.org/10.3390/biom11101488>

### B

**Basit, A., Liu, J., Rahim, K., Jiang, W., & Lou, H. (2018).** Thermophilic xylanases: From bench to bottle. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(7), 989-1002. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1425662>

**Belduz, A. O., Canakci, S., Chan, K.-G., Kahar, U. M., Chan, C. S., Yaakop, A. S., & Goh, K. M. (2015).** Genome sequence of *Anoxybacillus ayderensis* AB04T isolated from the Ayder hot spring in Turkey. *Standards in Genomic Sciences*, 10, 70. <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0065-2>

**Belghyti, D., El Guamri, Y., Ztít, 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). <https://doi.org/10.4314/afsci.v5i2.61730>

**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. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00376-0>

**Benkahoul, M., Talhi, A., & Boulefkhad, N. (2017).** Bactéries des environnements chauds Algériens: Isolement et mise en évidence de la production d'hydrolases. *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 25-35.

**Benziada, M. (2022).** The Hot Springs of Central Northern Algeria Hydro Geochemical and Therapeutic Aspects: Direct Applications and Therapeutic Value. In *Geothermal Energy*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.97803>

**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. <https://doi.org/10.5650/jos.ess16153>

**Borrelli, G. M., & Trono, D. (2015).** Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 20774-20840. <https://doi.org/10.3390/ijms160920774>

**Bouacem, K. (2016).** Caractérisation de souches bactériennes isolées à partir de sources thermales du Nord-Algérien: Etude des propriétés enzymatiques. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene. 189.

**Bouacem, K., Amziane-Touazi, M., Hania, W. B., Cayol, J.-L., Fardeau, M. L., 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). <https://www.aljest.net/index.php/aljest/article/view/591>

**Bouacem, K., Bouanane-Darenfed, A., Zaraï Jaouadi, N., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.074>

**Boutarfa, S., Senoussi, M. M., Gonzalez-Silvera, D., López-Jiménez, J. Á., & Aboal, M. (2022).** The Green Microalga *Coelastrella thermophila* var. Globulina (*Scenedesmaceae*, *Chlorophyta*) isolated from an algerian hot spring as a potential source of fatty acids. *Life (Basel, Switzerland)*, 12(4), 560. <https://doi.org/10.3390/life12040560>

**Brumm, P. J., Monsma, S., Keough, B., Jasinovica, S., Ferguson, E., Schoenfeld, T., Lodes, M., & Mead, D. A. (2015).** Complete Genome Sequence of *Thermus aquaticus* Y51MC23. *PLOS ONE*, 10(10), e0138674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138674>

### C

**Casillo, A., Lanzetta, R., Parrilli, M., & Corsaro, M. M. (2018).** Exopolysaccharides from marine and marine extremophilic bacteria: Structures, properties, ecological roles and applications. *Marine Drugs*, 16(2), 69. <https://doi.org/10.3390/md16020069>

**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, N. E., & 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. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111677>

**Chandra, P., Enespa, Singh, R., & Arora, P. K. (2020).** Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, 19, 169. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>

**Croteau, F. R., Rousseau, G. M., & Moineau, S. (2018).** Le système CRISPR-Cas : Au-delà de l'édition génomique. *Médecine/sciences*, 34(10), 813-819. <https://doi.org/10.1051/medsci/2018215>

**Curci, N., Strazzulli, A., De Lise, F., Iacono, R., Maurelli, L., Dal Piaz, F., Cobucci-Ponzano, B., & Moracci, M. (2019).** Identification of a novel esterase from the thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. *Extremophiles*, 23(4), 407-419. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01093-9>

### D

**Dahlquist, G. (2017).** Foundations for ageochemical characterization of mudpots In Yellowstone National Park. *Graduate Theses & Non-Theses*. [https://digitalcommons.mtech.edu/grad\\_rsch/132](https://digitalcommons.mtech.edu/grad_rsch/132)

**Deep, K., Poddar, A., & Das, S. K. (2013).** *Anoxybacillus suryakundensis* sp. nov, a moderately thermophilic, alkalitolerant bacterium isolated from hot spring at Jharkhand, India. *PLoS ONE*, 8(12), e85493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085493>

**Des Marais, D. J., & Walter, M. R. (2019).** Terrestrial hot spring systems: Introduction. *Astrobiology*, 19(12), 1419-1432. <https://doi.org/10.1089/ast.2018.1976>

**Dombrowski, N., Lee, J.-H., Williams, T. A., Offre, P., & Spang, A. (2019).** Genomic diversity, lifestyles and evolutionary origins of DPANN archaea. *FEMS Microbiology Letters*, 366(2), fnz008. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz008>

**Dumorné, K., Camacho Córdova, D., Astorga-Eló, M., & Renganathan, P. (2017).** Extremozymes: A potential source for Industrial Applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 649-659. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11006>

### E

**El Maarry, M. R., Erkeling, G., Kereszturi, Á., & Hargitai, H. (2014).** Crater Lake. In H. Hargitai & Á. Kereszturi, *Encyclopedia of Planetary Landforms* (p. 1-7). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9213-9\\_76-1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9213-9_76-1)

### F

**Filippidou, S., Jaussi, M., Junier, T., Wunderlin, T., Jeanneret, N., Palmieri, F., Palmieri, I., Roussel-Delif, L., Vieth-Hillebrand, A., Vetter, A., Chain, P. S., Regenspurg, S., & Junier, P. (2016).** *Anoxybacillus geothermalis* sp. Nov., a facultatively anaerobic, endospore-forming bacterium isolated from mineral deposits in a geothermal station. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(8), 2944-2951. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001125>

### G

**Gargaud, M. (2005).** *L'environnement de la terre primitive*. Presses Univ de Bordeaux.

**Guellati, F. Z., Touati, H., Tambosco, K., Quiblier, C., Humbert, J.-F., & Bensouilah, M. (2017).** Unusual cohabitation and competition between *Planktothrix rubescens* and *Microcystis* sp. (Cyanobacteria) in a subtropical reservoir (Hammam Debagh) located in Algeria. *PLOS ONE*, 12(8), e0183540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183540>

**Gomes, E., Souza, A. R., Orjuela, G. L., Silva, R., Oliveira, T., & Rodrigues, A. (2016).** *Applications and Benefits of Thermophilic Microorganisms and Their Enzymes for Industrial Biotechnology*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27951-0\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27951-0_21)

**Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Lakshmipriya, T., Tang, T.-H., Chen, Y., Hashim, U., Ruslinda, A. R., & Arshad, M. K. Md. (2015).** Biotechnological aspects and perspective of microbial keratinase production. *BioMed Research International*, 2015, 140726. <https://doi.org/10.1155/2015/140726>

**Grégoire, P., Fardeau, M.-L., Guasco, S., Bouanane-Darenfed, A., Michotey, V., Bonin, P., Dubourg, K., Cambar, J., & Ollivier, B. (2009).** Les micro-organismes de l'extrême. *La Presse Thermale et climatique*, 49-61.

**Guiraud, J., Galzy, P. (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. *Les Editions de l'Usine Nouvelle. Collection génie alimentaire. Paris*, 37.

**Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013).** A broader view : Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, 2013, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2013/329121>

### H

**Han, Y., Liu, E., Liu, L., Zhang, B., Wang, Y., Gui, M., Wu, R., & Li, P. (2015).** Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061. *Carbohydrate Polymers*, 115, 230-237. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.044>

**Hussein, E. I., Jacob, J. H., Shakhathreh, M. A. K., Abd Al-razaq, M. A., Juhmani, A. F., & Cornelison, C. T. (2017).** Exploring the microbial diversity in Jordanian hot springs by comparative metagenomic analysis. *Microbiology Open*, 6(6), e00521. <https://doi.org/10.1002/mbo3.521>

### I

**Ishino, S., & Ishino, Y. (2014).** DNA polymerases as useful reagents for biotechnology – the history of developmental research in the field. *Frontiers in Microbiology*, 5, 465. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00465>

**In Bouacem, k. (2021).** Cours L3 microbiologie.

### J

**Janusz, G., Pawlik, A., Świdarska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. (2020).** Laccase properties, physiological functions, and evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 966. <https://doi.org/10.3390/ijms21030966>

**Jay, Z. J., Rusch, D. B., Tringe, S. G., Bailey, C., Jennings, R. M., & Inskeep, W. P. (2014).** Predominant acidilobus-like populations from geothermal environments in Yellowstone National Park exhibit similar metabolic potential in different hypoxic microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(1), 294-305. <https://doi.org/10.1128/AEM.02860-13>

**Jiménez, D. J., Andreote, F. D., Chaves, D., Montaña, J. S., Osorio-Forero, C., Junca, H., Zambrano, M. M., & Baena, S. (2012).** Structural and functional insights from the metagenome of an acidic hot spring microbial planktonic community in the Colombian Andes. *PLoS One*, 7(12), e52069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052069>

**Jin, M., Gai, Y., Guo, X., Hou, Y., & Zeng, R. (2019).** Properties and applications of extremozymes from deep-sea extremophilic microorganisms: A mini review. *Marine Drugs*, 17(12), 656. <https://doi.org/10.3390/md17120656>

### K

**Kecha, M., Benallaoua, S., Touzel, J. P., Bonaly, R., & Duchiron, F. (2007).** Biochemical and phylogenetic characterization of a novel terrestrial hyperthermophilic archaeon pertaining to the genus *Pyrococcus* from an Algerian hydrothermal hot spring. *Extremophiles*, 11(1), 65-73. <https://doi.org/10.1007/s00792-006-0010-9>

**Khalil, A. B., Sivakumar, N., Arslan, M., Saleem, H., & Qarawi, S. (2018).** Insights into *Brevibacillus borstelensis* AK1 through whole genome sequencing: A thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Saudi Arabia. *BioMed Research International*, 2018, 5862437. <https://doi.org/10.1155/2018/5862437>

**Khatoun, H., Chavan, D., Anokhe, A., & Kalia, V. (2022).** *Catalase test: A biochemical protocol for bacterial identification.*

**Kim, B., Kim, Y. S., Han, J. W., Choi, G. J., & Kim, H. (2021).** Genome Sequence of *Brevibacillus brevis* HK544, an Antimicrobial Bacterium Isolated from Soil in Daejeon, South Korea. *Microbiology Resource Announcements*, 10(31), e0041721. <https://doi.org/10.1128/MRA.00417-21>

**Kumar, A. (2021).** Biobleaching: An eco-friendly approach to reduce chemical consumption and pollutants generation. *Physical Sciences Reviews*, 6(4), 20190044. <https://doi.org/10.1515/psr-2019-0044>

**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. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.088>

### L

**Lewis, A. M., Recalde, A., Bräsen, C., Counts, J. A., Nussbaum, P., Bost, J., Schocke, L., Shen, L., Willard, D. J., Quax, T. E. F., Peeters, E., Siebers, B., Albers, S.-V., & Kelly, R. M. (2021).** The biology of thermoacidophilic archaea from the order *Sulfolobales*. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(4), fuaa063. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa063>

**Liao, Z. (2018).** *Thermal prings and Geothermal Energy in the Qinghai-Tibetan Plateau and the Surroundings*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-3485-5>

**Lin, J.-H., Zhang, K.-C., Tao, W.-Y., Wang, D., & Li, S. (2019).** *Geobacillus* strains that have potential value in microbial enhanced oil recovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(20), 8339-8350. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10115-7>

### M

**Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Karamycheva, S., & Koonin, E. V. (2021).** A unique gene module in *Thermococcales* archaea Centered on a hypervariable protein containing immunoglobulin domains. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.721392>

**Mathew, G. M., Madhavan, A., Arun, K. B., Sindhu, R., Binod, P., Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2021).** Thermophilic chitinases: Structural, functional and engineering attributes for industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *193*(1), 142-164. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03416-5>

**Mechri, S., Bouacem, K., Allala, F., Khaled, M., Bouanane-darenfed, A., Hocine, H., & Jaouadi, B. (2021).** Preliminary screening and characterization of novel proteolytic enzymes produced by extremophilic bacteria isolated from Tunisian and Algerian biotopes. *Revue Nature et Technologie*, *13*(2), 61-73.

**Mehta, R., Singhal, P., Singh, H., Damle, D., & Sharma, A. K. (2016).** Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. *3 Biotech*, *6*(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0368-z>

**Morozova, V., Bokovaya, O., Kozlova, Yu., Kurilshikov, A., Babkin, I., Tupikin, A., Bondar, A., Ryabchikova, E., Brayanskaya, A., Peltek, S., & Tikunova, N. (2019).** A novel thermophilic *Aeribacillus* bacteriophage AP45 isolated from the Valley of Geysers, Kamchatka: Genome analysis suggests the existence of a new genus within the Siphoviridae family. *Extremophiles*, *23*(5), 599-612. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01119-2>

**Munson-McGee, J. H., Field, E. K., Bateson, M., Rooney, C., Stepanauskas, R., & Young, M. J. (2015).** *Nanoarchaeota*, their *Sulfolobales* host, and *Nanoarchaeotavirus* distribution across Yellowstone National Park hot springs. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(22), 7860-7868. <https://doi.org/10.1128/AEM.01539-15>

### N

**Naimi, M. N., & Cherif, A. (2021).** The hottest African thermal spring (Hammam Chellala, Algeria). *International Journal of Earth Sciences*, *110*(2), 651-652. <https://doi.org/10.1007/s00531-020-01970-1>

**Narsing Rao, M. P., Dong, Z.-Y., Luo, Z.-H., Li, M.-M., Liu, B.-B., Guo, S.-X., Hozzein, W. N., Xiao, M., & Li, W.-J. (2021).** Physicochemical and microbial diversity analyses of indian hot springs. *Frontiers in Microbiology*, 12, 627200. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.627200>

**Nguyen, P.-T., Nguyen, T.-T., Bui, D.-C., Hong, P.-T., Hoang, Q.-K., & Nguyen, H.-T. (2020).** Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: The manipulation of environmental stresses for industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6(4), 451-469. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020027>

**Nigam, P. (2013).** Microbial enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. *Biomolecules*, 3(4), 597-611. <https://doi.org/10.3390/biom3030597>.

### O

**Okpara, M. O. (2022).** Microbial Enzymes and Their Applications in Food Industry: A Mini-Review. *Advances in Enzyme Research*, 10(1), 23-47. <https://doi.org/10.4236/aer.2022.101002>

**Ouali, S. (2008).** Les sources thermales en Algérie. *Recherche et Développement*.(13), 17-18

**Ould Cheikh, M., El Kacemi, K., & Idrissi, L. (2012).** Caractérisation physico-chimique des eaux d'alimentation de la ville de Tijkja (Mauritanie). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(5), 2133. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v5i5.33>

**Oztas Gulmus, E., & Gormez, A. (2020).** Characterization and biotechnological application of protease from thermophilic *Thermomonas haemolytica*. *Archives of Microbiology*, 202(1), 153-159. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01728-7>

### 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. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0921-0>

**Panosyan, H., Margaryan, A., & Birkeland, N.-K. (2021).** *Anoxybacillus karvacharensis* sp. Nov., a novel thermophilic bacterium isolated from the Karvachar geothermal spring in Nagorno-Karabakh. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(10). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005035>

**Paul, K., Nonoh, J. O., Mikulski, L., & Brune, A. (2012).** *Methanoplasmatales*, *Thermoplasmatales*-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8245-8253. <https://doi.org/10.1128/AEM.02193-12>

**Podar, P. T., Yang, Z., Björnsdóttir, S. H., & Podar, M. (2020).** Comparative analysis of microbial diversity across temperature gradients in hot springs from Yellowstone and Iceland. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1625. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01625>

**Pol, A., Barends, T. R. M., Dietl, A., Khadem, A. F., Eygensteyn, J., Jetten, M. S. M., & Op den Camp, H. J. M. (2014).** Rare earth metals are essential for methanotrophic life in volcanic mudpots: Rare earth metals essential for methanotrophic life. *Environmental Microbiology*, *16*(1), 255-264. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12249>

**Pol, A., Heijmans, K., Harhangi, H. R., Tedesco, D., Jetten, M. S. M., & Op den Camp, H. J. M. (2007).** Methanotrophy below pH 1 by a new Verrucomicrobia species. *Nature*, *450*(7171), 874-878. <https://doi.org/10.1038/nature06222>

**Poli, A., Anzelmo, G., & Nicolaus, B. (2010).** Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: Production, characterization and biological activities. *Marine Drugs*, *8*(6), 1779-1802. <https://doi.org/10.3390/md8061779>

**Potprommanee, L., Wang, X.-Q., Han, Y.-J., Nyobe, D., Peng, Y.-P., Huang, Q., Liu, J., Liao, Y.-L., & Chang, K.-L. (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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175004>

### R

**Rabbani, M., Bagherinejad, M. R., Sadeghi, H. M., Shariat, Z. S., Etemadifar, Z., Moazen, F., Rahbari, M., Mafakher, L., & Zaghian, S. (2014).** Isolation and characterization of novel thermophilic lipase-secreting bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(4), 1113-1119.

**Rashid, N., & Aslam, M. (2020).** An overview of 25 years of research on *Thermococcus kodakarensis*, a genetically versatile model organism for archaeal research. *Folia Microbiologica*, *65*(1), 67-78. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00730-2>

**Reeve, B., Martinez-Klimova, E., de Jonghe, J., Leak, D. J., & Ellis, T. (2016).** The *Geobacillus* Plasmid Set: A modular toolkit for thermophile engineering. *ACS Synthetic Biology*, *5*(12), 1342-1347. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00298>

**Rekadwad, B., & Gonzalez, J. M. (2019).** Multidisciplinary involvement and potential of thermophiles. *Folia Microbiologica*, *64*(3), 389-406. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0662-8>

**Robinson, P. K. (2015).** Enzymes: Principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, *59*, 1-41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>

**Rouwet, D., Mora-Amador, R., Ramírez, C., González, G., Baldoni, E., Pecoraino, G., Inguaggiato, S., Capaccioni, B., Lucchi, F., & Tranne, C. A. (2021).** Response of a hydrothermal system to escalating phreatic unrest: The case of Turrialba and Irazú in Costa Rica (2007–2012). *Earth, Planets and Space*, 73(1), 142. <https://doi.org/10.1186/s40623-021-01471-8>

### S

**Saeed, A. M., El-Shatoury, E. H., & Sayed, H. A. E. (2021).** Statistical factorial designs for optimum production of thermostable  $\alpha$ -amylase by the degradative bacterium *Parageobacillus thermoglucosidasius* Pharon1 isolated from Sinai, Egypt. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 19(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00123-4>

**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. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071473>

**Sahoo, K., Sahoo, R. K., Gaur, M., & Subudhi, E. (2020).** Cellulolytic thermophilic microorganisms in white biotechnology: A review. *Folia Microbiologica*, 65(1), 25-43. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00710-6>

**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. <https://doi.org/10.3390/ijms21093128>

**Satyanarayana, T., Littlechild, J., & Kawarabayasi, Y. (Éds.). (2013).** Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5899-5>

**Schmidt, S. T., Yu, F. B., Blainey, P. C., May, A. P., & Quake, S. R. (2019).** Nucleic acid cleavage with a hyperthermophilic Cas9 from an uncultured *Ignavibacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(46), 23100-23105. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904273116>

**Schultz, J., Kallies, R., Nunes da Rocha, U., & Rosado, A. S. (2019).** Draft genome sequence of *Brevibacillus* sp. strain LEMMJ03, isolated from an antarctic volcano. *Microbiology Resource Announcements*, 8(40), e00921-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00921-19>

**Sharma, S., Vaid, S., Bhat, B., Singh, S., & Bajaj, B. K. (2019).** Thermostable enzymes for industrial biotechnology. In *Advances in Enzyme Technology* (p. 469-495). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00017-0>

**Singh, L., Sharma, G., Awasthi, G., Kumar, L., Ali, M. I., & Moin, S. (2019).** Screening, isolation and identification of thermophilic esterase enzyme isolated from *Rhodococcus* sp : LKE-021. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13(3), 1855-1861. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.3.63>

**Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016).** Microbial enzymes: Industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>

**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(5), 124. <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9938-7>

**Sran, K. S., Sundharam, S. S., Krishnamurthi, S., & Roy Choudhury, A. (2019).** Production, characterization and bio-emulsifying activity of a novel thermostable exopolysaccharide produced by a marine strain of *Rhodobacter johrii* CDR-SL 7Cii. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127, 240-249. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.045>

**Straub, C. T., Counts, J. A., Nguyen, D. M. N., Wu, C.-H., Zeldes, B. M., Crosby, J. R., Conway, J. M., Otten, J. K., Lipscomb, G. L., Schut, G. J., Adams, M. W. W., & Kelly, R. M. (2018).** Biotechnology of extremely thermophilic archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(5), 543-578. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy012>

**Suleiman, A. D., Abdul Rahman, N., Mohd Yusof, H., Mohd Shariff, F., & Yasid, N. A. (2020).** Effect of cultural conditions on protease production by a thermophilic *Geobacillus thermoglucosidasius* SKF4 isolated from Sungai Klah hot spring park, Malaysia. *Molecules*, 25(11), 2609. <https://doi.org/10.3390/molecules25112609>

**Sypka, M., Jodłowska, I., & Białkowska, A. M. (2021).** Keratinases as versatile enzymatic tools for sustainable development. *Biomolecules*, 11(12), 1900. <https://doi.org/10.3390/biom11121900>

### T

**Tarrahimofrad, H., Meimandipour, A., Arjmand, S., Beigi Nassiri, M., Jahangirian, E., Tavana, H., Zamani, J., Rahimnahal, S., & Aminzadeh, S. (2020).** Structural and biochemical characterization of a novel thermophilic Coh01147 protease. *PLoS ONE*, 15(6), e0234958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234958>

**Thapa, S., Li, H., OHair, J., Bhatti, S., Chen, F.-C., Nasr, K. A., Johnson, T., & Zhou, S. (2019).** Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular Biotechnology*, 61(8), 579-601. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00187-1>

**Thebti, W., Riahi, Y., Gharsalli, R., & Belhadj, O. (2016).** Screening and characterization of thermo-active enzymes of biotechnological interest produced by thermophilic *Bacillus* isolated from hot springs in Tunisia. *Acta Biochimica Polonica*, 63(3). [https://doi.org/10.18388/abp.2016\\_1271](https://doi.org/10.18388/abp.2016_1271)

**Tsotetsi, L., Prenaven, R., Modise, S., & Monapathi, M. (2020).** Isolation and identification of xylanase producing thermophilic bacteria from compost piles and optimization of xylanase production. *Journal of Biotech Research*, 11, 122-132.

### U

**Ulucay, O., Gormez, A., & Ozic, C. (2022).** Identification, characterization and hydrolase producing performance of thermophilic bacteria: geothermal hot springs in the eastern and southeastern Anatolia regions of Turkey. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 115(2), 253-270. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01678-5>

### V

**Vandenbergh, L. P. de S., Karp, S., Pagnoncelli, M. G. B., Tavares, M. von L., Junior, N. L., Diestra, K. V., Viesser, J. A., & Soccol, C. (2020).** *Classification of enzymes and catalytic properties*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819820-9.00002-8>

**Vavitsas, K., Glekas, P. D., & Hatzinikolaou, D. G. (2022).** Synthetic biology of thermophiles: Taking bioengineering to the extremes? *Applied Microbiology*, 2(1), 165-174. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010011>

**Verma, S., Meghwanshi, G. K., & Kumar, R. (2021).** Current perspectives for microbial lipases from extremophiles and metagenomics. *Biochimie*, 182, 23-36. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.12.027>

### W

**Wall, K., Cornell, J., Bizzoco, R. W., & Kelley, S. T. (2015).** Biodiversity hot spot on a hot spot : Novel extremophile diversity in Hawaiian fumaroles. *MicrobiologyOpen*, 4(2), 267-281. <https://doi.org/10.1002/mbo3.236>

**Wang, C.-Y., & Manga, M. (2021).** Geysers. In C.-Y. Wang & M. Manga (Éds.), *Water and Earthquakes* (p. 289-299). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-64308-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-64308-9_10)

**Wang, L., Lai, Q., Jebbar, M., Shao, Z., & Alain, K. (2020).** Complete genome sequence of *Methanofervidiccoccus* sp. A16, a thermophilic methanogen isolated from Mid Cayman Rise hydrothermal vent. *Marine Genomics*, 53, 100768. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2020.100768>

**Wang, J., Salem, D. R., & Sani, R. K. (2021).** Two new exopolysaccharides from a thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. WSUCF1 : Characterization and bioactivities. *New Biotechnology*, 61, 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.11.004>

**Wang, Y., Xu, C., Han, L., Li, C., Xiao, W., & Cui, X. (2021).** Diversity and distribution of culturable *Thermus* Species in terrestrial hot springs of southwestern Yunnan province in China. *Diversity*, 13(9), 455. <https://doi.org/10.3390/d13090455>

**Ward, L., Taylor, M. W., Power, J. F., Scott, B. J., McDonald, I. R., & Stott, M. B. (2017).** Microbial community dynamics in Inferno Crater Lake, a thermally fluctuating geothermal spring. *The ISME Journal*, 11(5), 1158-1167. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.193>

**Wemheuer, B., Taube, R., Akyol, P., Wemheuer, F., & Daniel, R. (2013).** Microbial diversity and biochemical potential encoded by thermal spring metagenomes derived from the Kamchatka Peninsula. *Archaea*, 2013, e136714. <https://doi.org/10.1155/2013/136714>.

**Wetzel, R.G. (2001).** Limnology lake and river ecosystems. Third Edition, Academic Press, San Diego, 1006 p.

### Y

**Yamagami, T., Matsukawa, H., Tsunekawa, S., Kawarabayasi, Y., Ishino, S., & Ishino, Y. (2016).** A longer finger-subdomain of family a DNA polymerase found by metagenomic analysis strengthens DNA binding and primer extension abilities. *Gene*, 576(2), 690695. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.030>

**Yassin, S. N., Jiru, T. M., & Indracanti, M. (2021).** Screening and characterization of thermostable amylase-producing acteria isolated from soil samples of Afdera, Afar Region, and Molecular Detection of Amylase-Coding Gene. *International Journal of Microbiology*, 2021, 5592885. <https://doi.org/10.1155/2021/5592885>

### Z

**Zarafeta, D., Kissas, D., Sayer, C., Gudbergdottir, S. R., Ladoukakis, E., Isupov, M. N., Chatziioannou, A., Peng, X., Littlechild, J. A., Skretas, G., & Kolisis, F. N. (2016).** Discovery and characterization of a thermostable and highly halotolerant GH5 cellulase from an icelandic hot spring isolate. *PLOS ONE*, 11(1), e0146454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146454>

**Zhao, J., Fang, H., & Zhang, D. (2020).** Expanding application of CRISPR-Cas9 system in microorganisms. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 5(4), 269-276. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2020.08.001>

**Zhu, D., Adebisi, W. A., Ahmad, F., Sethupathy, S., Danso, B., & Sun, J. (2020).** Recent development of extremophilic bacteria and their application in biorefinery. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 483. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00483>

### Webographies: Date et heure de consultation

[1]: [En ligne]<https://eugene.kaspersky.fr/2013/03/15/nouvelle-zelande-2013-jours-3-5-geysers-volcans-lacs-et-formations-rocheuses/>. Date: 02/04/2022. Heure: 16: 00.

[2]: [En ligne][https://fr.wikipedia.org/wiki/Parc\\_national\\_de\\_Yellowstone](https://fr.wikipedia.org/wiki/Parc_national_de_Yellowstone). Date: 02/04/2022. Heure: 16: 06.

[3]: [En ligne]<https://fr.dreamstime.com/photo-stock-source-thermale-vadmalahver-flud-ir-islande-image96259404>. Date: 02/04/2022. Heur: 16: 12.

[4]: [En ligne]<https://volcanoesland.com/attractions/uzon-caldera/>. Date: 02/04/2022. Heure:16:20.

[5]:[En ligne][https://www.researchgate.net/figure/Temperatures-a-lemergence-des-sources-thermales-du-Nord-de-lAlgerie-Fekraoui-et\\_fig18\\_320990749](https://www.researchgate.net/figure/Temperatures-a-lemergence-des-sources-thermales-du-Nord-de-lAlgerie-Fekraoui-et_fig18_320990749). Date: 10/04/2022. Heure: 18:45.

[6]: [En ligne]<https://www.wondermondo.com/hammam-meskhoutine-hammam-meskoutine/>. Date: 11/04/2022. Heure: 15:30.

[7]:[En ligne]<https://www.le-comptoir-geologique.com/fumeur-noir-lexique.html>. Date: 12/04/2022. Heur: 22: 30.

[8]:[En ligne]<https://www.pascalboegli.com/blog/photographie/italie-fumerolles-et-soufre-dans-le-crater-de-vulcano/>. Date: 13/04/2022. Heure: 09:15.

[9]:[Enligne][https://en.wikipedia.org/wiki/Mudpot#/media/File:Yellowstone\\_mud\\_pot\\_p1090998.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Mudpot#/media/File:Yellowstone_mud_pot_p1090998.jpg). Date: 13/04/2022. Heure: 10:30.

[10]:[En ligne] [https://en.wikipedia.org/wiki/Inferno\\_Crater\\_Lake](https://en.wikipedia.org/wiki/Inferno_Crater_Lake). Date: 13/04/2022. 15:00

[11]:[En ligne]Google Maps. Date: 11/05/2022. Heure: 13:00.

[12]: [En ligne]<https://www.futura-sciences.com/sciences/definitions/matiere-turbidite-6317/>. Date: 16/06/2022. Heure: 22:00.

[13]: [En ligne]<https://uae.fr/glossaire/durete-de-leau-degre-francais/>. Date: 17/06/2022. Heure: 20:00.

# *Annexes*

## **Annexe 1**

### **Matériel utilisé**

Bouteille d'échantillon; autoclave; étuve; bain marie; agitateur chauffant a barreau; magnétique; balance; réfrigérateur; lampe à UV; microscope photonique; bec bunsen; boîtes de Petri; pipettes Pasteur; micropipette; erlenmeyer; éprouvette; flacons en verre; le porte-tubes; tubes à essai en verre; cuvette; turbidimètre; fiole jaugée 100 mL; burette; pissette d'eau distillée; spatule; verre à montre; potence.

## **Annexe2**

### **Etat frais**

- Mettre entre lame et lamelle une goutte de l'échantillon.
- Observer au grossissement X40.

## **Annexe 3**

### **Coloration de Gram**

- Réaliser un frottis bactérien et le fixer à la flamme.
- Recouvrir le frottis de la solution de cristal violet, laisser agir 1 minute.
- Rincer à l'eau.
- Recouvrir la préparation de Lugol, laisser agir 45 secondes, deux fois.
- Rincer à l'eau.
- Décolorer à l'alcool 95°, laisser agir 30 secondes.
- Rincer à l'eau courante.
- Recouvrir la lame de la solution de Fuchsine, laisser agir 1 minute.
- Rincer abondamment à l'eau, égouttée, sécher entre deux feuilles de papier buvard très propres.
- Observation au grossissement 100 avec une goutte d'huile à immersion.

## Annexe 4

### Produits chimiques utilisés

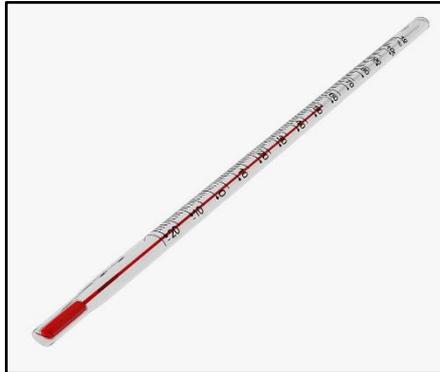
Nom du produit	Formule chimique	Concentrations
<b>Hydroxyde de sodium</b>	Na OH	0.2N
<b>Sel di-sodique acide éthylènes diamine tétra acétique</b>	EDTA (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> N <sub>a2</sub> O <sub>8</sub> 2H <sub>2</sub> O).	0.01mol/L
<b>Murexide</b>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	Pincée
<b>Phénolphtaléine</b>	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	Quelques gouttes
<b>NET : Noir Eriochrome T</b>	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> SNa	Pincée
<b>Méthyle-orange</b>	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> S	Quelques gouttes
<b>Acide chlorhydrique</b>	HCL	2M
<b>Solution tampon ammoniacal</b>	NH <sub>4</sub> CL	pH=10

## Annexe 5

Cations	Réactifs
<b>Cu</b>	CH <sub>3</sub> COOH (Acide acétique) + K <sub>4</sub> [Fe(CN) 6] (Ferrocyanure de potassium)
<b>Ca</b>	NH <sub>4</sub> Cl (Chlorure d'ammonium) + NH <sub>4</sub> OH (Ammoniaque) + K <sub>4</sub> [Fe(CN) 6] (Ferrocyanure de potassium)
<b>Pb</b>	KI (Iodure de potassium)
<b>Cd</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NS (Thio-acétamide)
<b>Fe</b>	K <sub>4</sub> [Fe(CN) 6] (Ferrocyanure de potassium)
<b>Cr</b>	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)
<b>Al</b>	CH <sub>3</sub> COOH (Acide acétique) + Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Hydrogénophosphate de sodium)
<b>Mn</b>	HNO <sub>3</sub> (Acide nitrique) + KIO <sub>4</sub> (Cristaux de périodate de potassium)
<b>Ni</b>	DMg
<b>Zn</b>	HCl (Acide chlorhydrique) + K <sub>4</sub> [Fe(CN) 6] (Ferrocyanure de potassium)
<b>Mg</b>	NH <sub>4</sub> Cl (Chlorure d'ammonium) + NH <sub>4</sub> OH (Ammoniaque) + Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Hydrogénophosphate de sodium)
<b>Na</b>	Uranyle acétate de zinc
<b>K</b>	HClO <sub>4</sub> (Acide perchlorique)
<b>NH<sub>4</sub></b>	NaOH (Hydroxyde de sodium) + Réactif de crusslaire

## Annexe 6

### Appareils utilisés



Thermomètre



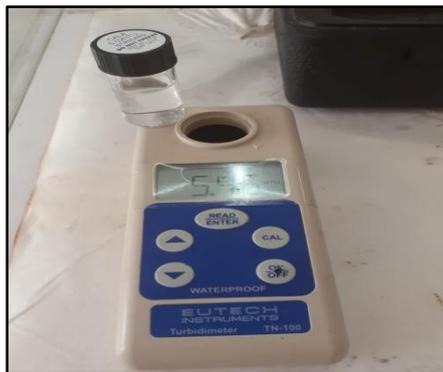
pH-mètre



Oxymètre



Conductimètre.



Turbidimètre

## Résumé

Compte tenu de l'abondance des habitats géothermiques dans le monde, de leur hétérogénéité physique et chimique et de leur grande diversité microbienne, les sources thermales algériennes constituent une importante ressource inexploitée pour la biodiversité d'extrémophiles. Les microorganismes thermophiles sont des sources durables qui pourraient être mieux exploitées dans de nombreux domaines biotechnologiques. Dans le cadre de cette étude, 13 souches bactériennes ont été isolées de la source chaude Hammam Essalihine Assif El hammam Adekar dans la wilaya de Bejaïa, ayant une température de 45°C. Les paramètres physicochimiques de l'eau de cette source ainsi que les propriétés physiologiques, morphologiques, biochimiques des isolats ont été déterminées. Les bactéries que nous avons pu isoler sont assez diverses en termes d'attributs environnementaux, englobant une gamme de température allant de 30 à 60 °C, une gamme de salinité allant 0,5 à 9 %, et des pH de croissance à tendance alcaline. En raison de ces propriétés importantes, ces enzymes peuvent être attrayantes pour des applications industrielles. Dans ce contexte, il s'agit d'une étude préliminaire montrant la diversité des bactéries productrices d'enzymes thermophiles au niveau de notre source.

**Mots clés:** Sources thermales, bactéries thermophiles, criblage enzymatique, enzymes thermostables.

## Abstract

Given the abundance of geothermal habitats in the world, their physical and chemical heterogeneity and their great microbial diversity, Algerian thermal springs constitute an important untapped resource for the biodiversity of extremophiles. Thermophilic microorganisms are sustainable sources that could be better exploited in many biotechnological fields. As part of this study, 13 bacterial strains were isolated from the Hammam Essalihine Assif Elhammam Adekar hot spring in the wilaya of Bejaïa, with a temperature of 45°C. The physicochemical parameters of the water from this source as well as the physiological, morphological and biochemical properties of the isolates were determined. The bacteria we were able to isolate are quite diverse in terms of environmental attributes, encompassing a temperature range of 30-60°C, a salinity range of 0.5-9%, and alkaline-prone growth pH. Due to these important properties, these enzymes may be attractive for industrial applications. In this context, this is a preliminary study showing the diversity of bacteria producing thermophilic enzymes at our source.

**Keywords:** Thermal springs, thermophilic bacteria, enzymatic screening, thermostable enzymes.