

## Bactéries des environnements chauds Algériens: isolement et mise en évidence de la production d'hydrolases

Reçu le 19/11/2016– Accepté le 26/04/2017

Malika BENKAHOUL, Ahlem TALHI, Nessma BOULEFKHAD

Université des Frères Mentouri- Constantine1, Laboratoire de Biologie et Environnement, BP 325 Route de Ain El Bey, Constantine, Algérie

[benkahoul.malika@umc.edu.dz](mailto:benkahoul.malika@umc.edu.dz)

### Résumé

Dans l'objectif de rechercher des enzymes produites par des bactéries extrémophiles isolées de l'eau thermale et le sol avoisinant des sources thermales se trouvant à hammam, Debegh, Guelma, Algérie. Treize souches bactériennes ont été purifiées, testées pour leur activité catalytique et identifiées. Les résultats indiquent la richesse des prélèvements en bactéries capables de produire des enzymes exo-cellulaires. En effet, l'eau thermale et le sol environnant ces sources chaudes sont une source potentielle d'enzymes pouvant être thermorésistantes et donc intéressantes pour les industries. La caractérisation phénétique réalisée pour les souches bactériennes a permis d'avoir accès à certaines propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques de ces microorganismes. Les résultats ont montré la présence de deux genres connus, *Bacillus* et *Thermobacillus* avec dominance du genre *Bacillus* et d'autres genres dont les tests réalisés restent insuffisants pour une identification plus poussée.

**Mots clés :** enzymes, source thermale, bactéries extrémophiles, Sol

### Abstract

As a part of a search for enzymes produced by extremophilic microorganisms isolated from the thermal water and the surrounding soil of thermal sources located in hammam, Debegh, Guelma, Algeria. Thirteen bacterial strains were purified, then tested for their catalytic activity, and finally identified. The desired enzymatic activities (proteolytic, amylolytic, cellulolytic and pectinolytic) of bacterial strains were tested on a specific medium for each enzymatic activity. All the bacterial strains have at least one enzymatic activity. This allows the selection of these strains for their identification. The results indicated the richness of the sampling site (thermal water and soil) in bacterial strains capable of producing important enzymes. Indeed, this site is a potential source of enzymes that can be thermo-resistant and therefore very interesting for their industrial applications. The phenetic characterization performed for bacterial strains allowed to have an access to certain morphological, biochemical and physiological properties of these microorganisms. The results showed the presence of 2 known genera, *Bacillus* and *Thermobacillus* with the dominance of the genus *Bacillus*. As well as other genera whose tests are insufficient to determine them.

**Key words:** enzymes, thermal spring, extremophilic bacteria, Soil

### ملخص

كجزء من البحث عن الإنزيمات التي تنتجها الكائنات الحية المعزولة من المياه الحارة والتربة المجاورة للينابيع الحارة الموجودة في حمام الدباغ، قالمة، الجزائر. ثلاث عشرة سلالة بكتيرية تم عزلها واختبار نشاطها الإنزيمي ومن ثم تحديدها. النشاطات الإنزيمية التي تم البحث عنها هي تحليل البروتين، النشاء، كربوكسيميثيل سلولوز و البكتين السلالات. جميع السلالات البكتيرية لها نشاط إنزيمي واحد على الأقل، تشير النتائج إلى ثراء موقع أخذ العينات (المياه الحرارية والتربة) بسلالات بكتيرية قادرة على إنتاج أنشطة إنزيمية هامة. في الواقع هذا الموقع هو مصدر محتمل لإنزيمات تملك القدرة لمقاومة الحرارة وبالتالي غاية في الأهمية لتطبيقاتها في الميادين الصناعية. دراسة الخصائص الظاهرية للسلالات البكتيرية سمحت بتحديد بعض خصائصها المورفولوجية، البيوكيميائية و الفيزيولوجية حيث أظهرت وجود نوعين (العصيات و التارموباسيلس) مع هيمنة جنس العصيات بالإضافة إلى أجناس أخرى.

Depuis très longtemps, les enzymes ont toujours fait partie de notre vie quotidienne. Elles sont présentes dans toutes les cellules et sont indispensables pour la survie de toutes les espèces vivantes. En effet, les enzymes contrôlent les procédés métaboliques et sont capables de dégrader et de transformer différents composés se trouvant dans l'environnement du vivant (Bergmeyer *et al.*, 1979 ; Amaud *et al.*, 1993 ; Pelmont, 1995 ; Drouin, 2005). Un avantage pouvant être utilisé par certaines industries dans différents domaines.

L'emploi des enzymes est de plus en plus très sollicité par les différentes industries qui n'ont vu le jour que grâce à la mise sur le marché d'enzymes purifiés. En effet, en 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées (Patel *et al.*, 2005). En 1998, le marché mondial des enzymes a été estimé à environ 1.5 milliard de dollars et des augmentations annuelles allant de 2% à 25% de ce chiffre ment, dépendant du domaine ont été signalés (Van Behen et Li, 2002).

La demande mondiale pour les enzymes d'origine microbienne croît d'une année à l'autre et ce afin d'améliorer certains procédés de fabrications tels que l'industrie du textile, la papeterie, la dépollution, l'industrie alimentaire et bien d'autres. Une attention particulière pour les enzymes provenant de microorganismes extrémophiles a fait l'objet de plusieurs études. En effet, les microorganismes extrémophiles ont développés des stratégies très variées pour s'adapter aux contraintes environnementales (température, pression, salinité et pH). Les enzymes qui participent à ces stratégies seront sans doute d'un grand intérêt pour intervenir dans les procédés industriels surement travaillant en conditions de haute température ou de grande salinité (Gregoire *et al.*, 2009).

De nombreux environnements extrêmes, tels que les sources acides ou chaudes, les lacs salins et/ ou alcalins, les déserts et fonds marins trouvés dans la nature contiennent des microorganismes connus comme étant extrémophiles (Satyanarayana *et al.*, 2005).

## MATERIEL ET METHODES

### 1. Présentation du site de prélèvement

Les échantillons (sol et eau) utilisés dans ce travail proviennent des eaux thermales et sol proche de ces sources chaudes de Hammam Debehg, Guelma, Algérie.

Hammam Debehg (appelé aussi Hammam Meskhoutine) est situé à 20 km au Sud du Chef-lieu de la Wilaya de Guelma (36°27'N, 7°16'E) et à 320m d'altitude. Le site comprend neuf sources d'eau hyperthermale, les

plus chaudes d'Algérie, atteignant jusqu'à 98 °C au point d'émergence de l'eau.

L'eau est de nature saline, bicarbonatée calcique et chlorurée sodique, avec dégagement d'hydrogène sulfuré. Elle est exploitée par les stations thermales environnantes (Boughlali, 2003).

- Sol : Le prélèvement du sol (S) est effectué à l'aide d'une spatule stérile. La couche des trois premiers centimètres est écartée (Buhot, 1973 ; Mihail et Ailcorel, 1987 ; Saadoune et Momani, 1997). Cent à cent-cinquante (100-150) g du sol sont recueillis dans des flacons stériles.
- Eau : Les échantillons d'eau, ont été prélevés à différents niveaux:
  - i. : Au niveau d'une source d'eau thermale dont la température est égale à 98 °C.
  - ii. : Au niveau d'une source d'eau thermale située à côté (mètres) de la première (96 °C).
  - iii. : Au niveau d'un point avoisinant la source d'eau thermale à une distance de un mètre (65 °C).
  - iv. : Au niveau d'un point avoisinant la source d'eau thermale à une distance de quatre mètres dont la température est égale à 45 °C.

### 2. Isolement et purification des microorganismes

Pour préparer la suspension mère du sol, 10g de l'échantillon sont dissouts dans 90 ml d'eau physiologique stérile. Une homogénéisation de la suspension est effectuée pendant 30min à l'aide d'un agitateur vortex.

Pour chaque type d'échantillon (sol et eau), une série de dilutions ( $10^{-1}$  -  $10^{-4}$ ) est réalisée à partir de la solution mère. 100  $\mu$ L de chaque dilution sont étalés à la surface de lagélose nutritive (GN). Trois répétitions par boîte de Pétri ont été réalisés. Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont incubées à 45 °C. Les observations ont été effectuées après 24 et 48 heures.

Après incubation et développement des différentes isolats, des repiquages successifs ont été effectués pour purifier les isolats jusqu'à obtention de clones purs dans chaque boîte de Pétri (Giraud, 1998). La conservation se fait dans des tubes sur gélose inclinée (GN). Après 24 heures d'incubation, les cultures ont été conservées à +4 °C.

### 3. La recherche des activités enzymatiques

#### 3.1. La recherche de l'activité protéolytique

Le milieu gélosé contenant 5% du lait écrémé est utilisé dans la mise en évidence de la présence d'une activité protéolytique. L'incubation a lieu à 45 °C pendant 48h.

L'hydrolyse des protéines du lait est indiquée par l'apparition d'une zone claire autour de la strie, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse (Gordon *et al.*, 1973 ; De Vos *et al.*, 2009).

### 3.2. La recherche de l'activité amylolytique

Ce test est réalisé en cultivant les souches bactériennes sur milieu gélose nutritive contenant 1% d'amidon soluble. Les boîtes sont incubées à 45 °C pendant 48h. Après incubation, le milieu gélosé est recouvert d'une solution de lugol pendant 30 secondes puis un rinçage à l'eau distillée. La présence d'une activité amylolytique se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des colonies (absence de coloration autour des colonies). A l'inverse, un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture (Les zones contenant de l'amidon se colorent en brun) (De Vos *et al.*, 2009).

### 3.3. La recherche de l'activité cellulolytique

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

### 3.4. La recherche de l'activité pectinolytique

Le milieu pectine agar est utilisé pour la sélection des souches bactériennes productrices de la pectinase. Après incubation à 45°C pendant 48h, les boîtes sont inondées par une solution d'acétate de cuivre à 75% pendant 10 minutes. Un résultat positif se traduit par un halo clair autour des stries. A l'inverse, un résultat négatif se manifeste par l'absence de zones d'hydrolyse

## 4. Identification des microorganismes sélectionnés

### 4.1. Identification macroscopique

C'est une description directe faite sur boîtes d'isolement qui permet de déterminer l'aspect macroscopique des colonies (forme, aspect, couleur, contour, taille, etc.) (Badiset *et al.*, 2005). L'identification macroscopique des bactéries se fait après leur croissance sur milieu GN et leur incubation à 45 °C pendant 24 h.

### 4.2. Identification microscopique

L'observation microscopique s'effectue à l'aide d'un microscope optique à l'état frais (à différents grossissements : X 40 et à l'immersion) et par coloration de Gram (10X 100 par l'ajout d'une goutte d'immersion).

### 4.3. Tests biochimiques : Il s'agit de rechercher :

- Le type respiratoire sur milieu
- VF (Viande-Foie)
- Test de Catalase
- Test de l'Oxydase
- Test de la nitrate réductase
- Test Mannitol-Mobilité
- Utilisation des sucres sur milieu TSI (Triple Sugar Iron)

### 4.4. Test de thermo-résistance

Ce test est une confirmation de la présence de structures sporales. Des cultures bactériennes réalisées dans des tubes, contenant du bouillon nutritif et incubées à 45 °C pendant 24h. Des dilutions sont réalisées dans de l'eau physiologique à partir des cultures précédentes et sont chauffées dans un bain Marie à 80 °C pendant 12 minutes suivi d'un refroidissement immédiat dans de l'eau froide. Un volume de 1ml de chaque dilution est ensuite ensemencé sur gélose nutritive en boîte. La lecture est faite après incubation à 45°C pendant 24 à 48h.

### 4.5. Culture sur milieux sélectifs

L'observation des colonies peut être d'un grand intérêt taxonomique lorsque la culture est faite sur des milieux spécifiques en faisant apparaître certains caractères. Il s'agit des milieux : Hektoen, Chocolat, Chapman et Gélose au sang frais.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

### 1. Mise en évidence des activités enzymatiques

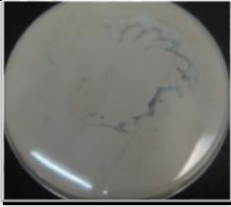


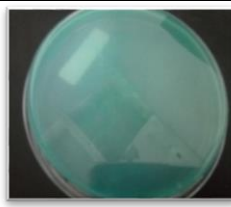
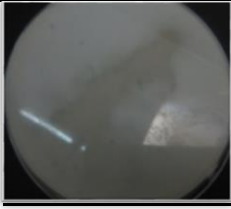



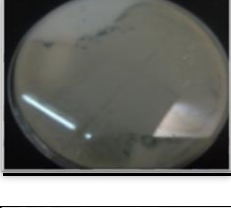


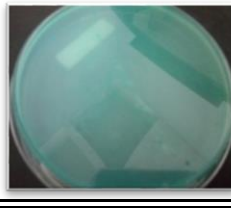
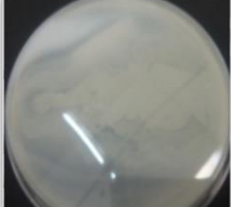
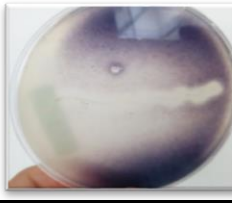

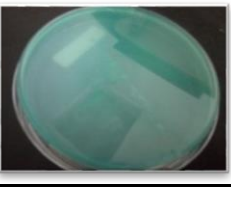
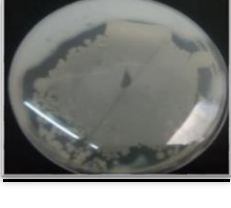
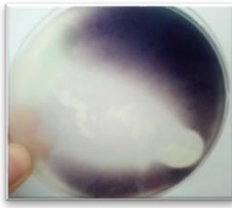
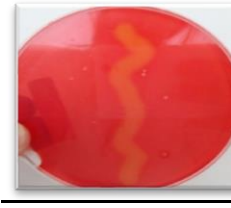


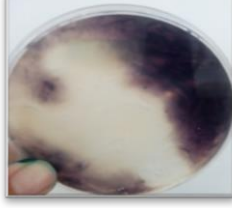
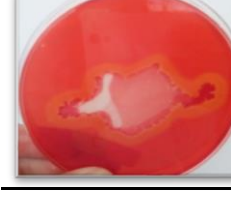
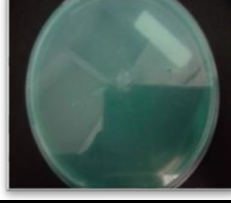
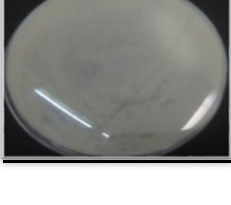

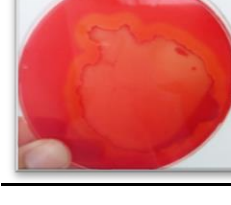

Les activités protéolytiques, amylolytiques, cellulolytiques et pectinolytiques ont été mises en évidence en utilisant les milieux suivants: gélose au lait, GN à amidon 1%, milieu gélosé à 0,5% de CMC, milieu Pectine-agar, après incubation à 45 °C pendant 48h. Les résultats sont regroupés dans les tableaux 1 et 2.

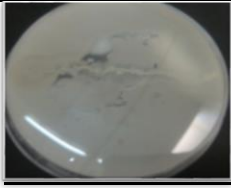
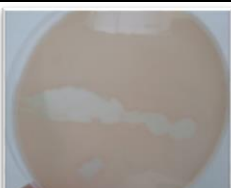






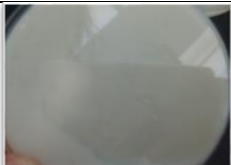



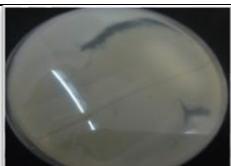



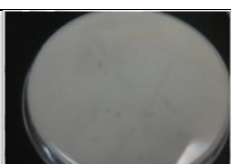

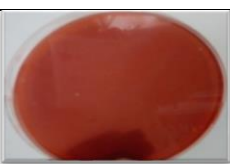
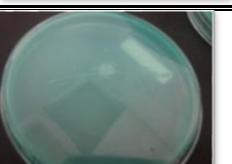


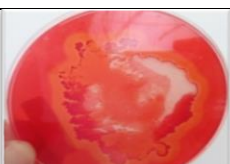

Les tableaux 1 et 2 montrent que toutes les souches possèdent une activité protéolytique.

Les membres thermophiles tels que les *Bacillaceae* fournissent d'importantes protéases thermostables à l'industrie, cas de la thermolysine qui est une métalloprotéase produite par *Geobacillus stearothermophilus* avec une demi-vie d'une heure à 80 °C (Rao *et al.*, 1998 ; Haki et Rakshit, 2003).

D'après les résultats mentionnés dans les deux tableaux précédents, on note que la plupart des souches sont capables d'hydrolyser l'amidon, ce qui signifie que ces dernières possèdent une amylase.

**Tableau 1 :** Zones d'hydrolyses des souches bactériennes testées après 24 h d'incubation

Isolats	Protéase	Amylase	Cellulase	Pectinase
SA1				
SS1				
SB1				
SS2				
SC1				
SB2				
SA2				

Isolats	Protéase	Amylase	Cellulase	Pectinase
SC2				
SS3				
SA3				
SB3				
SA4				
SA5				

**Tableau 2 :** Activités hydrolytiques des souches bactériennes après 48h d'incubation

Isolats	Protéase	Amylase	Cellulase	Péctinase
A1	+	+	+	-
S1	+	+	+	-
B1	+	+	-	-
S2	+	+	+	-
C1	+	+	+	-
SB2	+	-	+	-
SA2	+	+	+	-
SC2	+	+	+	-
SS3	+	+	+	-
SA3	+	+	-	-
SB3	+	+	+	-
SA4	-	+	-	-
SA5	+	+	+	-

Selon Satyanarayana etJohri (2005), de nombreuses espèces du genre *Bacillus* sont connues pour leur capacité à produire des  $\alpha$ -amylases thermostables. Celles-ci comprennent des  $\alpha$ -amylases de *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *Geobacillus thermoleovorans*, *B. stearothermophilus*, et *B. thermoamyloliquefaciens*.

Par rapport aux résultats des cultures mentionnées les tableaux 1 et 2, le carboxyméthylcellulose (CMC) est hydrolysé par 10 isolats bactériens.

Aucune des bactéries isolées (tableaux 1et2) n'est capable d'hydrolyser la pectine. De ce fait toutes sont dépourvues de la pectinase exo-cellulaire.

Pour l'utilisation des substrats naturels, un nombre de bactéries thermophiles produisent une gamme d'enzymes hydrolytiques (protéase, cellulase, amylase, glucosidase, glucoamylase, pullulanases, cyclodextrine glycosyltransférase). Elles sont également capables de dégrader d'autres polysaccharides telsque le glycogène fourni par des cellules animales ou microbiennes (Bertoldo et Antranikian, 2002), les composés polyphénoliques, les n-alcanes, et même certains polymères synthétiques comme le plastique (Pinzón- Martínez *et al.*, 2010).

Le bagage enzymatique des microorganismes est influencé par la disponibilité des nutriments dans l'environnement. Une plus grande capacité d'adaptation implique des mécanismes métaboliques plus développés comparativement à des organismes qui en sont dépourvus.

## 2. Identification des micro-organismes sélectionnés

L'identification des souches isolées a porté sur l'étude des caractères morphologiques et biochimiques.

### 2.1. Etude macroscopique

Tous les isolats bactériens obtenus ont des aspects différents capables de pousser à 45°C pendant 24 à 48 h sur GN. L'observation macroscopique de ces isolats est représentée dans le tableau 3.

L'observation macroscopique des isolats sur GN a permis de dégager deux aspects différents de colonies : crémeux et rugueux. Parmi les 13 isolats, six ont un aspect rugueux et sept ont un aspect crémeux.

Sur l'ensemble, les isolats ont exprimé une croissance optimale à la température d'incubation de 45 °C. Selon Perry et Staley (1997) et selon Souza et Martins (2001) ces isolats peuvent être classés parmi les thermophiles. Il est important de signaler que nos isolats sont incapables de se développer à 55 °C malgré que quelques uns proviennent de

sites ayant des températures beaucoup plus élevées. Il est probable que ces isolats ne puissent pas se trouver en état actif en sachant que la température est un facteur important conditionnant leur prolifération. Le même raisonnement peut expliquer l'isolement de certains organismes à des températures beaucoup plus basses que leur optimum de croissance (Niehaus *et al.*, 1999). Selon Weigel (1990), il est également possible d'isoler des microorganismes thermophiles à partir de la glace arctique.

**Tableau 3 :** Critères macroscopiques des isolats bactériens sur milieu GN

Isolat	Forme	Taille	Aspect	Couleur	Contour
D1	Ronde	Petite	Crémeux	Crème	Régulier
SS1	Ronde	Petite	Rugueux	Crème	Régulier
SB1	Ronde	Moy	Crémeux	crème	Régulier
SS2	Ronde	Moy	Crémeux	Crème	Régulier
SC1	Ronde	Moy	Crémeux	Beige	Régulier
SB2	Ronde	Petite	Rugueux	crème	Régulier
SA1	Ronde	Petite	Crémeux	Beige	Régulier
SC2	Ronde	Petite	Crémeux	Beige	Régulier
SS3	Ronde	Petite	Rugueux	Beige	Irrégulier
SA2	Ronde	Petite	Rugueux	Blanche	Irrégulier
SB3	Ronde	Moy	Crémeux	Crème	Régulier
SA3	Ronde	Moy	Rugueux	Beige	Régulier
SA4	Ronde	Petite	Rugueux	Blanche	Régulier

Ainsi différents types phénotypiques ont été retrouvés aussi bien dans les échantillons de la source d'eau thermale que dans le sol. Ceci nous laisse supposer que la température n'est pas l'unique facteur qui joue sur la diversité des organismes présents dans ce type d'environnement. D'autres facteurs comme la composition minérale et organique, la localisation géographique des sites géothermaux peuvent également entrer en jeu.

### 2.2. Etude microscopique

L'observation à l'état frais et la coloration de Gram ont permis une information sur la morphologie des cellules bactériennes, leur mobilité et la composition de leur paroi. Les résultats sont dans le tableau 4.

La coloration de Gram, effectuée sur des cultures jeunes sur milieu GN a révélé que dix souches sont à Gram positif et trois à Gram négatif. Les formes cellulaires observées sous microscope photonique sont : des bâtonnets parfois enflés à l'extrémité isolés ou arrangés en longues chaînes selon les isolats, des cocci et aussi des coccobacilles.

L'observation des bactéries à l'état frais montre que certains isolats sont très mobiles (SD1 ; SS1, SB2, SA2), tandis que la plus part sont lentes et immobiles et présentent

un mouvement Brawnien (SB1, SS2, SC1, SA1, SC2, SS3, SB3, SA3, SA4).

**Tableau 4 :** Critères microscopiques des isolats bactériens sur milieu GN

Isolat	Gram	Regroup.	Mobilité	Forme
SD1	-	Longue chaîne	Mobile	Cocci
SS1	+	Isolé	Mobile	Longs Bacilles
SB1	+	Isolé	Immobile	Gros bacilles
SS2	+	Longue chaîne	Immobile	Cocci
SC1	+	Longue chaîne	Immobile	Coccobacille
SB2	+	Isolé	Mobile	Petits bâtonnets
SA1	+	Isolé	Immobile	Petits bâtonnets
SC2	+	Isolé	Immobile	Coccobacilles
SS3	+	Isolé	Immobile	Bacilles
SA2	+	Isolé et longue chaîne	Mobile	Cocci
SB3	-	Isolé et longue chaîne	immobile	Longs bacilles
SA3	+	Longue chaîne	Immobile	Bacilles
SA4	-	Isolé	Immobile	Cocci

Les formes cellulaires observées en microscopie photonique sont : des bâtonnets parfois enflés à l'extrémité isolés ou arrangés en longues chaînes selon les isolats (SS1, SB1, SB2, SA1, SS3, SA3). L'aspect coccobacille est rencontré uniquement chez deux souches (SC1 et SC2) alors que la forme coccoïde avec un mode de formation en longue chaîne est observée chez quatre souches (SD1, SA2, SA4, SS2).

La plupart des souches sont des bacilles (SD1, SB1, SB2, SB3, SA1, SS3, SA3). L'aspect coccobacille est rencontré uniquement chez deux souches (SC1 et SC2) alors que la forme coccoïde avec un mode de formation en longue chaîne est observée chez quatre souches (SD1, SA2, SA4, SS2).

### 3.3. Tests biochimiques

Les résultats de la caractérisation biochimique des isolats bactériens sont représentés dans le tableau 5

Le type respiratoire des bactéries est déterminé par la culture sur milieu Viande-Foie. Tous les isolats peuvent croître tout au long du milieu, il s'agit de bactéries aérobies-anaérobies facultatives.

Les résultats montrent que toutes les souches bactériennes étudiées possèdent au moins l'une des deux enzymes respiratoires recherchées (oxydase et catalase). Toutes les souches sont oxydase positives alors que dix uniquement sont catalase positives (SD1, SS1, SB1, SC1, SB2, SC2, SS3, SB3, SA3, SA4) car chacune d'elles présente des bulles après le dépôt du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette enzyme contient du fer qui catalyse la décomposition de ce dernier. C'est le cas de la plupart des isolats bactériens aérobies et anaérobies facultatives thermophiles (Nazina *et al.*, 2001).

Le milieu Triple SugarIron (TSI) renseigne sur la capacité à dégrader le glucose, le lactose et/ou le saccharose. L'oxydation est observée chez toutes les souches et elle est accompagnée d'une production de H<sub>2</sub>S.

La fermentation du mannitol a été observée chez une souche. Un virage faible de l'indicateur au jaune a également été noté. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'acidification produite par les bactéries aéro-anaérobies facultatives est en général insuffisante face à l'importance du pouvoir tampon du milieu (Joffin et Leyral, 2006).

La majorité des souches sont immobiles (SB1, SS2, SC1, SA1, SC2, SS3, SB3, SA3, SA4). En effet, seulement quatre (SD1, SS1, SB2, SA2) ont donné un résultat positif pour ce caractère sur le milieu mannitol-mobilité.

La réduction du nitrate en nitrite est observée chez toutes les souches bactériennes étudiées ce qui indique qu'elles possèdent l'enzyme Nitrate Réductase.

### 3.4. Test de thermo-résistance

Le traitement thermique des souches bactériennes présentées sous forme de bacilles est effectué par ensemencement d'une suspension bactérienne chauffée à 80°C pendant 12min, sur Gélose nutritive à 45 °C durant 24h a permis d'obtenir des colonies résistantes par développement de spores qui représentent une forme particulière de résistance chez le groupe de *Bacillus* (Dellarras, 2014). Cette sporulation est un phénomène naturel dans le cycle de croissance de ce groupe (Ponce *et al.*, 2008). Il intervient lorsque les conditions deviennent défavorables à la croissance (carence en nutriments, en sels minéraux, manque d'eau), c'est-à-dire lorsque l'organisme est en situation de stress (Barillet *et al.*, 2012).

**Tableau 5 :** Caractérisations biochimiques des différents isolats bactériens

Isolats	catalase	oxydase	Type respiratoire	Mannitol-mobilité		Nitrate réductase	TSI	H2S
				Mobilité	Mannitol			
SD1	+	+	AAF	+	Partielle	+	+	+
SS1	+	+	AAF	+	Partielle	+	+	+
SB1	+	+	AAF	-	Partielle	+	+	+
SS2	-	+	AAF	-	Complète	+	+	+
SC1	+	+	AAF	-	Partielle	+	+	+
SB2	+	+	AAF	+	Partielle	+	+	+
SA1	-	+	AAF	-	Partielle	+	+	+
SC2	+	+	AAF	-	Partielle	+	+	+
SS3	+	+	AAF	-	Partielle	+	+	+
SA2	-	+	AAF	+	Partielle	+	+	+
SB3	+	+	AAF	-	Partielle	+	+	+
SA3	+	+	AAF	-	Partielle	+	+	+
SA4	+	+	AAF	-	Partielle	+	+	+

+ : Positif ; - : Négatif ; AAF :Aéro-anaérobie-facultatif

Les facteurs environnementaux des milieux extrêmes, tels que la température, le pH, le degré de salinité et l'activité de l'eau, influencent fortement la survie des microorganismes et conduisent à une réduction de leur diversité d'une part, et développe chez d'autres, une résistance par production de substances particulières d'autre part (Bar *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2002).

### 3.5. Culture sur milieux sélectifs

Sur le milieu de Chapman, toutes les souches ont poussés mais elles ne représentent aucune caractérisation du genre *Staphylococcus*. Ces dernières apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté, si non les colonies sont de couleur blanche (Biorad, 2007). Le développement bactérien sur ce milieu ne constitue qu'une indication, d'autres bactéries peuvent y cultiver.

La culture sur milieu Hektoen n'as pas permis le développement des colonies ce qui explique que nos souches n'appartiennent pas aux Entérobactéries (Guiraud, 1998).

Le milieu Chocolat a permis le développement de toutes les souches bactériennes car c'est un milieu d'enrichissement. La gélose à sang frais a permis le développement de la majorité des souches bactériennes mais ces dernières ne représentent aucune caractéristique hémolytique. Les caractères d'identification ont permis l'orientation vers les genres *Bacillus*, *Thermobacillus* et autres genres dont les tests effectués sont insuffisant pour les déterminer, avec une dominance du genre *Bacillus*.

Le genre *Bacillus* a été isolé de tous les échantillons ; sa présence est due à la capacité de ce genre à se déplacer et à leur résistance aux conditions environnementales difficiles en plus de son adaptation aux environnements chauds (Kawasaki *et al.*, 2012 ; Annizet *et al.*, 2015). Les souches appartenant au genre *Bacillus* ont été dominantes dans les études menées par différents chercheurs à travers le monde. Aanniz *et al.* (2015) ont récupéré 97,5% des souches appartenant à ce genre isolées des sources thermales marocaines. De plus, Maugeri *et al.* (2001) ont isolé 87 bactéries thermophiles, aérobies et sporogènes des îles Eoliennes (Italie) où les espèces dominantes retenues appartenaient au genre *Bacillus*. De plus, notons que le *Bacillus* thermophile a été la souche dominante des sources thermales jordaniennes comme l'ont rapporté Abou-Shanab (2007) et Malkawi et Al-Omari (2010).

Les thermophiles facultatifs font partie du genre *Bacillus* et ont l'aptitude à croître à des températures



mésophiles et thermophiles (30-55°C), en fonction de la souche. Quelques exemples d'espèces comprennent *Bacillus coagulans*, *B.licheniformis*, *B.pumilus*, *B.sporothermodurans* et *Bacillus subtilis* (Barbarous et Gulsun, 2014).

## CONCLUSION

Les microorganismes thermophiles sont très recherchés par différentes industries à cause de leurs propriétés dépassant celles de leurs contreparties mésophiles. Des bactéries ont été isolées depuis l'eau thermale et le sol avoisinant des sources thermales à hammam Debegh, Guelma, Algérie. Le milieu de culture utilisé dans l'isolement et la purification est la gélose nutritive (GN).

Une mise en évidence de la production de quatre enzymes hydrolytiques extracellulaires (protéase, amylase, cellulase et pectinase) par les 13 souches bactériennes isolées à 45 °C est réalisée sur le même milieu d'isolement avec l'addition d'un substrat spécifique pour chaque enzyme.

Les résultats ont montré que toutes les souches possédaient une ou plusieurs activités hydrolytiques, dominées par les activités protéolytiques et amylolytiques. Les 13 souches bactériennes ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique suivie d'une analyse biochimique. En effet, l'identification des souches bactériennes sélectionnées a montré que ce sont des aérobies facultatifs, thermophiles, se développent à 45 °C sur gélose nutritive, la majorité de ces souches sont immobiles, sous forme bâtonnet à Gram positif ou négatif, avec des extrémités arrondies, ou sous forme de cocci et de coccobacilles isolés ou en longue chaîne, possédant une oxydase, la majorité sont catalase positives, dégradant le mannitol.

Les formes sporulantes représentent deux genres *Bacillus* et *Thermobacillus* avec la dominance du premier.

## REFERENCES

- [1]- Abou-Shanab R. A. I. (2007). Characterization and 16S rDNA identification of thermo-tolerant bacteria isolated from hot springs. *Journal of Applied Sciences Research*, **vol. 3**. Pp : 994-1000.
- [2]- Aanniz T., Ouadghiri M., Melloul M. *et al.* (2015). Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes and desert soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, **vol. 46** : 443-453.
- [3]- Amaud A., Berset C., Bocquet J., Bouix M., Cerisier Y., Cuvellier E.G.F., De Nettancourt D., Engasser J.M., GaW P., Goursaud J., Cnrenini M., Guiraud J.P., Richard, H., Steenbrugge, H., Teoule, E., Thomas, D., Vandecasteele, J. P. (1993). *Biotechnologies*. 4<sup>ème</sup> éd., Scriban R. (éd), Technique et Documentation Lavoisier Paris, France, 904 p.
- [4]- Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. & Ouzrout R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « arabia et kabyle ». *Science and Technologie*, **23**: 30-37.
- [5]- Bar M., Von Hardenberg J., Meron E and Provenzale A. (2002). Modelling the survival of bacteria in dry lands: the advantage of being dormant. *Proc. R Soc. Lond B. Biol. Sci.* **269**: 937-942.
- [6]- Barbarous Ozer., Gulsun Akdemir-Evrendilek. (2014). *Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments*. CRC Press. p : 13.
- [7]- Baril E., Coroller L., Couvert O., El Jabri M., Leguerinel I., Postollec F. and Mafart P. (2012). Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus* spp. as a function of temperature, pH and a w. *Food microbiology*, **32** : 79-86.
- [8]- Bergmeyer H.U., Gawekn K., *et al.* (1979). *Principes de l'analyse enzymatique*. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris. 17p.
- [9]- Bertoldo C., Antranikian G. (2002). Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**: 151-60. Bio-Rad. (2007). Chapman - mannitol salt agar. URL : [www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org).
- [10]- Boughlali M. (2003). Thermalisme et thalassothérapie en Algérie. *Press. Therm. Climat.*, **140**: 161-165.
- [11]- Bragger J.M., Daniel R.M., Coolbear T., Morgan H.W. (1989). Very stable enzymes from extremely thermophilic archae bacteria and eubacteria. *Appl. Microbiol. And Biotech.* **31**: 556-561.
- [12]- Buhot D. (1973). Echantillonnage de sols. Conservation et préparation des échantillons. Problème statistique. *Am. Phytopathol.* **5** : 296-298
- [13]- Delarras C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire: Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques*. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier. 476 p.
- [14]- Delarras C. (2014). *Pratique en microbiologie de laboratoire, Recherche de bactéries et de levures-moisissures*. Edition Lavoisier. pp : 113-114.

- [15]- De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> Ed., The Firmicute. Springer. New York. **Volume 3** : 63-67.
- [16]- Dinsdale A.E., Halket G., Coorevits A., Van Landschoot A., Busse H.J., De VOS P., Logan N.A. (2011). Emended descriptions of *Geobacillus thermoleovorans* and *Geobacillus thermocatenulatus*. *Int. J. of Syst. and Evo.Microbio.* **61**: 1802–1810.
- [17]- Drouin M. (2005). Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maître es-sciences (M.Sc.). Canada.
- [18]- Giraud J. (1998). Microbiologie alimentaire. Edition Donod, Paris. pp: 8-101. p 330.
- [19]- Gordonr E., Haynesw C., Pang CH.N. (1973). The Genus *Bacillus* (Agricultural Handbook no. 427). Washington DC: United States Department of Agriculture.
- [20]- Gregoire P., Fardeau ML., Guaso S., Bouanane A., Michotey V., Bonin P., Dubourg K., Cambar J., Ollivier B. (2009). Les micro-organismes de l'extrême. *Presstherm climat.* **146** : 49-61.
- [21]- Guiraud J. P. (1998). Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. pp : 7-330.
- [22]- Haki, G.D. and Rakshit, S.K. (2003). Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: A Review. *BioresourceTechnology.* **89** : 17-34.
- [23]- Joffin JN. andLeyral G. (2006). Microbiologie Technique Tome 1 " Dictionnaire des techniques". CRDP AQUITAINE. Bordeaux. 189-250.
- [24]- Kawasaki Y., Aoki M., Makino Y. (2012). Characterization of moderately thermophilic bacteria isolated from saline hot spring in Japan. *Microbiology Indonesia.* **Vol. 5**. pp. 56–60.
- [25]- Malkawi H. I. and Al-Omari M. N. (2010). Culture-dependent and culture-independent approaches to study the bacterial and archaeal diversity from jordanian hot springs. *African Journal of Microbiology Research*, **vol. 4**, no. 10, pp. 923–932.
- [26]- Maugeri T. L., Gugliandolo C., Caccamo D. , Stackebrandt E. (2001). A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from shallow, marine vents. *Systematic and Applied Microbiology.* **vol. 24**. pp: 572–587.
- [27]- Mihail J.D , Alcoren S.M. (1987). *Marcophomina phaseolma* spatial patterns in cultivated and sampling strategies. *Phytopathology.***77** : 1126-1131.
- [28]- Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau A.B., Novikova E.V., Grigoryan A.A., Ivanova A.E., Lysenko A.M., Petrunyaka V.V., Osipov G.A., Belyaev S.S., Ivanov M.V. (2001). Taxonomic study of aerobic *thermophilic bacilli*: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzunensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothersophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothersophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int., J., Syst., Evol., Microbiol.*, **51**:433-446.
- [29]- Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M., Antranikian G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**: 711-729.
- [30]- Patel R., Dodia M., Singh S.P. (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. : Production and optimization. *Proc. Biochem.*, **40** : 3569– 3575.
- [31]- Pelmont J. (1995). Enzymes : Catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire de Grenoble. **7** :652-654.
- [32]- Perry I. I. and Staley I. T., (1997). Taxonomy of eubacteria and archaea," in *Microbiology: Diversity and Dynamics*, II. Perry and IT.Staley, Eds., pp : 388–413, Saunders College Publishing, Orlando, Fla, USA.
- [33]- Pinzon-Martinez DL, Rodrigez-Gomez C, Minana-Galbis D, Carrillo-Chavez JA, Valerio-Alfaro G, Oliart-RosR. (2010). Thermophilic bacteria from Mexican thermal environments: isolation and potential applications. *Environ Technol.* **31**: 957-66.
- [34]- Ponce A., Stephanie A. C and Pun T. Y. (2008). Detection and viability assessment of endospore-forming pathogens. *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems.* Springer New York. pp : 481- 523.
- [35]- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (1998). Molecular and

- biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62** : 597-635.
- [36]- Rocha E.P., Matic I. and Taddei F. (2002). Over-representation of repeats in stress response genes: a strategy to increase versatility under stressful conditions *Nucleic. Acids. Res.* **30**: 1886-1894.
- [37]- Saadoun I., EL. Momani I. (1997). Stryptoyces from Jordan soil active against *Agrobacterium tumefaciens*. *Actinomycetes.* **8** : 29-36.
- [38]- Satyanarayana T., Raghukumar Ch., Roswall T. and Shivaji S. (2005). Extremophilic microbes : Diversity and perspectives. *current .Sci.* **89**:1.
- [39]- Souza A. N. and Martins M. L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, **vol. 32**. 1517 p.
- [40]- Van Beilen J. B. and Z. Li. (2002). Enzyme technology: an overview. *Curr. and Biotechnol.* **13** : 338-344.
- [41]- Wiegel J. (1990). Temperature spans for growth: a hypothesis and discussion. *F.E.M.S. Microbiol. Rev.*, **75**:155-170.