



UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEN  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
et des Sciences de la Terre et de l'Univers  
Département de Biologie

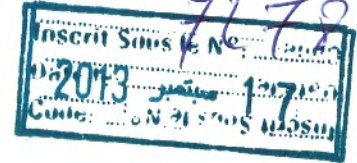
Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement  
مخبر الميكربولوجيا التطبيقية للاغذية للبيوطي وللبيئة



## Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE



Présenté par

Mr. ZETTAM MOHAMMED REDA

Thème

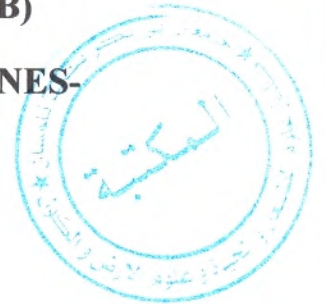
**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA BIODIVERSITE DES *BACILLUS*  
EXTREMOPHILES ISOLEES DE LA SOURCE THERMALE DE  
HAMMAM DEBAGH -GUELMA- (GRIFFON B)  
-SCREENING D'ACTIVITES ANTIMICROBIENNES-**

Soutenu le 27/06/2013

Devant le Jury composé de :

Présidente :	Mme HASSAINE H.	Maitre de conférences classe A	Univ. Tlemcen
Promotrice :	Mme KHELIL N.	Maitre de conférences classe A	Univ. Tlemcen
Examineur :	Mr GHUELLAI L.	Maitre-assistant chargé de cours	Univ. Saïda

Année Universitaire : 2012-2013





UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEM  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
et des Sciences de la Terre et de l'Univers  
Département de Biologie

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement  
مخبر الميكربولوجيا التطبيقية للأغذية للبيوطي وللبيئة



## Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE

*Présenté par*

**Mr. ZETTAM MOHAMMED REDA**

Thème

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA BIODIVERSITE DES *BACILLUS*  
EXTREMOPHILES ISOLES DE LA SOURCE THERMALE DE  
HAMMAM DEBAGH -GUELMA- (GRIFFON B)  
-SCREENING D'ACTIVITES ANTIMICROBIENNES-**



Soutenu le 27/06/2013

Devant le Jury composé de :

Présidente :	Mme HASSAINE H.	Maitre de conférences classe A	Univ. Tlemcen
Promotrice :	Mme KHELIL N.	Maitre de conférences classe A	Univ. Tlemcen
Examineur :	Mr GHUELLAI L.	Maitre-assistant chargé de cours	Univ. Saïda

Année Universitaire : 2012-2013



# Remerciements



Gloire à **Allah** seigneur du monde et que sa bénédiction soit sur le dernier des prophètes **Mohamed**(PSL) qui nous a permis d'atteindre notre objectif. Au terme de ce travail, Je dois remercier particulièrement:

- Madame **Khelil Nihel** née **Klouche.**, Maitre de conférences classe A à l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, pour son encadrement et pour son appui ses conseils et ses orientations tout au long de ce travail. Je lui adresse mes vifs remerciements et ma reconnaissance.
- Madame **Hassaine H.**, Maitre de conférences classe A à l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, qui m'a fait l'honneur de présider ce Jury
- Monsieur **Guellai L.**, maitre-assistant chargé de cours à l'université de Saïda pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.
- J'adresse également un immense merci à tous les membres du laboratoire **L.A.M.A.A.B.E.** pour leur aide et leur soutien considérable.

Je dois également exprimer ma gratitude à:

- les étudiantes du Magistère de Maitrise de la Qualité Microbiologique et du Développement Microbien, **Fatima** et **Nadia** pour leurs aides au sein du laboratoire.
- Tous mes amis, en particulier **Ahmed, Amine, Ismail.**

*Avec toute ma reconnaissance*

*Zettam M<sup>th</sup> Réda*

# *Dédicaces*

Je dédie ce modeste travail à :

- \* A mes parents
- \* A mon frère Hicham
- \* A mes sœurs Hasna et Bouchra
- \* A ma famille
- \* A mes Amies
- \* Aux étudiants de Master de microbiologie promotion 2012/2013



## Sommaire

Liste des figures  
Liste des tableaux

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Partie bibliographique</b>	
<b>I. Généralités sur les extrémophiles et leurs biotopes</b> .....	<b>3</b>
1.1 Les extrémophiles.....	3
1.2. Les milieux extrêmes.....	3
1.2.1. Les eaux souterraines.....	4
1.2.2 .Les milieux hyper-salins.....	4
1.2.3. Les sources thermales et hydrothermales.....	4
1.2.3.1. Les bactéries des sources hydrothermales.....	5
1.2.3.2. Adaptation aux hautes températures.....	6
1.2.3.3. Importance biotechnologique des études des microorganismes des sources hydrothermales.....	7
<b>II. Le genre <i>Bacillus</i></b> .....	<b>8</b>
2.1. Caractéristiques des <i>Bacillus</i> .....	8
2.2. Nomenclature des rangs taxonomiques.....	9
2.2.1. Le domaine des Eubactéries.....	9
2.2.2. Phylum des Firmicutes.....	9
2.2.3. La classe des Bacilli.....	9
2.2.4. L'ordre des bacillales.....	11
2.2.5. Le genre <i>Bacillus</i> .....	12
<b>III. Biotechnologie des <i>Bacillus</i></b> .....	<b>14</b>
3.1. Utilisation des <i>Bacillus</i> en biotechnologie.....	14
3.1.1. Les activités enzymatiques du <i>Bacillus</i> thermophiles et hyperthermophiles.....	15
3.1.2. Production des antibiotiques par les <i>Bacillus</i> .....	16
3.2. Méthodes de screening des métabolites secondaires.....	18
3.2.1. Screening primaire.....	18
3.2.2. Screening secondaire.....	18
<b>Matériels et méthodes</b>	
1. Le site d'étude « Hammam Debagh (Meskoutine) –Guelma- ».....	19
2. Données physico-chimique de la source thermale.....	20
3. Prélèvement d'échantillons.....	20
4. Isolement et purification des isolats.....	22
5. Conservation des isolats.....	23
6. Détermination des caractéristiques phénotypiques.....	23
6.1. Caractéristiques morphologiques et culturales.....	23
6.1.1. Examen à l'état frais.....	23

6.1.2. Coloration par bleu de méthylène.....	23
6.1.3. Coloration de Gram.....	23
6.2. Caractéristiques biochimiques.....	24
6.2.1. Recherche de la catalase.....	24
6.2.2. Test mannitol – mobilité.....	24
6.2.3. Mise en évidence de type respiratoire.....	24
6.2.4. Plaque api 20 <sup>E</sup> .....	25
7. Mise en évidence des enzymes extracellulaire.....	25
7.1. Détermination de l'activité amylolytique.....	25
7.2. Détermination de l'activité protéolytique.....	25
7.3. Détermination de l'activité lipolytique.....	26
7.3.1. Hydrolyse de Tween 80.....	26
7.3.2. Hydrolyse de la lécithine.....	26
8. Screening primaire d'activités antimicrobiennes.....	26
8.1. Inocula des bactéries test.....	26
8.2. Technique des cylindres d'agar.....	27
8.3. Technique des puits.....	27

## Résultats et discussion

1. Détermination des caractéristiques phénotypiques.....	28
1.1. Caractéristiques morphologiques.....	28
1.2. Caractéristiques culturelles.....	30
1.3. Caractéristiques biochimiques.....	30
1.3.1. Recherche de la catalase.....	30
1.3.2. Test mannitol-mobilité.....	30
1.3.3. Mise en évidence de type respiratoire.....	31
1.3.4. Plaque api 20 <sup>E</sup> .....	31
2. Mise en évidence des enzymes extracellulaires.....	32
3. Screening primaire d'activités antimicrobiennes.....	34
3.1. Technique des cylindres d'agar.....	34
3.2. Technique des puits.....	38
4. Discussion.....	40
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>44</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>46</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>52</b>



## Listes des figures

<b>Figure 1 :</b> Source thermale, Hammam Debagh, Guelma, Algérie .....	5
<b>Figure 2 :</b> Aspect microscopique d'une souche du <i>Bacillus</i> 4-1T ( <b>Gugliandolo et al., 2003</b> ).....	8
<b>Figure 3 :</b> Représentation schématique d'arbre phylogénétique ( <b>Woese et al, 1990</b> ).....	10
<b>Figure 4 :</b> Localisation de site d'étude : Hammam Debagh –Guelma- ( <b>Google Earth</b> )....	19
<b>Figure 5.</b> Source hydrothermale de Hammam Debagh -prélèvement d'échantillons-.....	22
<b>Figure 6 :</b> Coloration au bleu de méthylène de la souche LMB3504.....	28
<b>Figure 7 :</b> Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100).....	29
<b>Figure 8 :</b> Aspect macroscopique des souches isolées sur GN.....	30
<b>Figure 9 :</b> Exemple de Résultat des cultures de deux souches LMB3505, LMB3506 sur le milieu Mannitol-mobilité.....	31
<b>Figure 10 :</b> Exemples d'activités hydrolytiques détectées.....	33
<b>Figure 11 :</b> Test d'activité antimicrobienne des souches étudiées vis-à-vis <i>pseudomonas aeruginosa</i> .....	36
<b>Figure 12 :</b> Test d'activité antimicrobienne des souches étudiées vis à vis <i>klebsiella pneumoniae</i> .....	36
<b>Figure 13 :</b> Test d'activité antimicrobienne des souches étudiées vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> .....	37
<b>Figure 14 :</b> Test d'activité antimicrobienne des souches étudiées vis-à-vis <i>Bacillus cereus</i> .....	37
<b>Figure 15 :</b> Test d'activité antimicrobienne des souches étudiées vis-à-vis <i>candida albicans</i> .....	38
<b>Figure 16 :</b> Test d'activité antimicrobienne par la technique des puits de LMB3504 et LMB3506 vis-à-vis <i>pseudomonas aeruginosa</i> .....	39
<b>Figure 17 :</b> Test d'activité antimicrobienne par la technique des puits de LMB3504 et LMB3506 vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : classification des extremophiles ( <b>Van den Burg, 2003</b> ).....	3
<b>Tableau 2</b> : composition de l'ordre des Bacillales ( <b>Euzéby, 2002 ; Larpent, 2000</b> ).....	11
<b>Tableau 3</b> : taxons de la famille des <i>Bacillaceae</i> appartenant au genre <i>Bacillus</i> ( <b>Larpent, 2000</b> ).....	13
<b>Tableau 4</b> : Quelques antibiotiques synthétisés par <i>Bacillus.Sp</i> ( <b>Schallmey et al., 2004</b> )...	17
<b>Tableau 5</b> : caractéristiques physico-chimiques de la source chaude (Bassin B) ( <b>Yakhlef et al.,2012</b> ).....	21
<b>Tableau 6</b> : Germes test de référence utilisées.....	26
<b>Tableau 7</b> : Caractérisation biochimique des isolats.....	32
<b>Tableau 8</b> : résultats d'activités enzymatiques des isolats étudiées.....	32
<b>Tableau 9</b> : Résultats de l'activité antimicrobienne des souches étudiées par la technique des cylindres d'agar.....	35
<b>Tableau 10</b> : Résultats de l'activité antimicrobienne par la technique des puits.....	38



# **INTRODUCTION**

---

## Introduction

L'étude des extrémophiles fournit de nouvelles clefs à la compréhension des processus de la vie dans des conditions extrêmes et démêle les mécanismes développés par les systèmes biologiques afin d'y faire face. Ces connaissances acquises sont par la suite employées pour développer de nouveaux bioproduits et bioprocédés dans divers champs tels que les industries de produits chimiques, pharmaceutiques et alimentaires (**Antranikian, 2009**).

Les microorganismes appelés "extrémophiles" sont spécifiquement adaptés à des milieux écologiques particuliers où ils se développent activement alors qu'ils ne survivent pas dans des conditions "ordinaires".

Parmi les microorganismes qualifiés d'extrémophiles, on rencontre ceux qui vivent en présence de fortes concentrations de sel (halophiles), ceux qui se développent à des températures froides ou chaudes (psychrophiles et thermophiles), et/ou dans des milieux très acides ou basiques (acidophiles et alcalophiles) ou sous pressions élevées (piézophiles). (**Gomri, 2012**), Cette diversité des environnements auxquels les différents extrémophiles se sont adaptés procure beaucoup d'occasions passionnantes à une série d'applications (**Van den Burg, 2003**).

La température est une variable importante de chaque écosystème. Pour cette raison, la classification des organismes vivants sur la base de leur température optimale de croissance est considérée comme un aspect fondamental de la taxonomie microbiologique. La vie aux températures élevées est classée en forme thermophile ou hyperthermophile (**Gomri, 2012**).

L'Algérie est un pays riche par sa diversité écologique et géologique, il existe ainsi des écosystèmes extrêmes tels que les sebkhas, les sols désertiques et surtout les sources chaudes, exploitées pour leurs bienfaits, notamment thérapeutiques. Cependant, ces sources n'ont été que très peu étudiées d'un point de vue biodiversité et ce n'est que récemment qu'on a commencé à s'intéresser aux microorganismes habitants ces environnements locaux et les publications concernant le sujet sont encore très rares (**Yakhlef et al., 2012**).

Les sources hydrothermales font donc figures de véritables gisements potentiels de molécules originales pour de nouvelles applications industrielles. Et ceci aussi bien dans le

domaine de la biologie moléculaire que dans les biotransformations à haute valeur ajoutée. **(Cité de la Mer, 2012).**

Pourtant l'étude des microorganismes thermophiles ou hyperthermophiles indigènes à ces milieux hostiles à la vie peut aider à mieux exploiter cette importante source de molécules bioactives à des températures nettement plus élevées que celles d'organismes conventionnels, en particuliers leurs enzymes et antibiotiques.

La principale source d'antibiotiques est représentée par les microorganismes qui, depuis longtemps font l'objet de nombreuses recherches et ont permis et permettent toujours la découverte de métabolites secondaires intéressants et exploitables par l'homme.

Parmi les microorganismes qui possèdent un potentiel biotechnologique important, Les *Bacillus* représentent donc une bonne source de métabolites anticellulaires **(Schallmeyer et al., 2004).**

L'objectif de ce présent travail est un screening des *Bacillus* extrêmophiles isolés de la source thermale de Hammam Debagh (Guelma) et la mise en évidence d'activités antimicrobiennes.

Notre travail est structuré en trois parties dont la première est une revue bibliographique traitant les extrêmophiles et leurs biotopes, le genre *Bacillus* et leur importance en biotechnologie. La seconde partie rapporte la méthodologie détaillée du travail et la troisième expose nos résultats obtenus comparés et discutés suivie d'une conclusion générale et des perspectives.

# **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

---





## I. Généralités sur les extrémophiles et leurs biotopes

### 1.1. Les extrémophiles

Les extrémophiles sont un groupe de microorganismes qui peuvent évoluer pour exister dans des environnements extrêmes et qui ont une grande capacité d'adaptation à des conditions très dures pour vivre (**Demirjian et al., 2001**).

Les extrémophiles sont répartis dans des différentes classes selon les paramètres physiques qui caractérisent leur milieu de développement, les thermophiles, les psychophiles, les halophiles, les alcalophiles, les acidophiles et les piezophiles (Tableau 1).

**Tableau 1** : classification des extrémophiles (**Van den Burg, 2003**).

type	Caractéristiques de croissance
<b>Thermophiles</b>	Température > 80 °C (hyperthermophile) et 60-80 °C (thermophiles)
<b>Psychophiles</b>	Température < 15 °C
<b>Halophiles</b>	Concentration élevée de sel
<b>Alcalophiles</b>	pH > 9
<b>Acidophiles</b>	pH < 2-3
<b>Piezophiles</b>	Haute pression

Selon (**Baker et al., 2001**), les thermophiles sont généralement séparés en trois catégories selon leurs températures cardinales de croissance : les thermophiles (30-70°C), thermophiles extrêmes (55-85°C) et les hyperthermophiles (75-113°C).

### 1.2. Les milieux extrêmes

Les milieux extrêmes sont des zones écologiques dont les conditions physiques et chimiques sont très difficiles pour la vie des organismes qui sont adaptés à des biotopes normaux. Par contre ces milieux sont favorables pour le développement des organismes extrémophiles qui ont des capacités d'adaptation à ces environnements.

### 1.2.1. Les eaux souterraines

Les eaux souterraines est une partie des eaux de précipitation qui s'infiltrent dans le sol pour donner ce qu'on appelle les eaux souterraines. Elles constituent une provision d'eau potable inestimable pour l'humanité.

En milieu urbain ou industriel, les nappes phréatiques peuvent devenir rapidement fragiles à la surexploitation ou à la contamination. Pour cela, plusieurs géologues commencent à faire l'inventaire de cette ressource et à développer des outils pour une protection et une exploitation rationnelle (**Moulla *et al.*, 2003**).

### 1.2.2. Les milieux hyper-salins

Les milieux hyper-salins peuvent être considérés comme des environnements extrêmes par rapport à leurs grandes concentrations de salinité. Ces endroits extrêmes sont des milieux sélectifs pour les bactéries halophiles (**Boutaiba *et al.*, 2011**).

Parmi les milieux hyper-salins on peut citer : les sédiments des marais salants, des lacs salés, et les sols hyper-salins.

### 1.2.3. Les sources thermales et hydrothermales

Les sources hydrothermales constituent un environnement remarquable, qui n'a sans doute pas changé fondamentalement au cours des 3,7 milliards d'années qui nous séparent de la formation de l'océan primordial. (**Laubier, 1991**) (Figure 1).

L'origine des sources hydrothermales profondes est une conséquence de la dérive des continents. La surface du globe est divisée en sept plaques de croûte terrestre principales rigides et en une série de plaques, plus petites, qui sont en mouvements et s'écartent les unes des autres. Ces plaques sont séparées par des dorsales divisées en de multiples segments séparés par des zones de fracture. La vitesse d'expansion des segments de dorsale varie de 1 à 280 mm par an. La zone de fracture est caractérisée par une très forte activité volcanique. La coulée de lave monte en surface, se refroidit et se solidifie. Ces sites sont le siège des principales manifestations hydrothermales. L'eau de mer s'infiltré dans les fissures et se réchauffe au contact de la roche basaltique (ou roches profondes du manteau) en fusion, pouvant atteindre des températures très élevées (jusqu'à 400 °C) puis, par d'autres fissures, remonte en surface. Ce fluide hydrothermal est riche en composés réduits tels que H<sub>2</sub>S, CH<sub>4</sub>,



$\text{NH}_4^+$  ainsi qu'en éléments métalliques tels que  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  (Minic *et al.*, 2006).



**Figure 1** : Source thermale, Hammam Debagh, Guelma, Algérie  
Photos prises avec un appareil photo numérique Sony DSC- S750

#### 1.2.3.1. Les bactéries des sources hydrothermales

Autour des sources hydrothermales, la température varie selon un gradient fluctuant, où se retrouvent différentes populations de bactéries. Certaines se développent à la température normale à environ 2 °C (bactéries psychrophiles adaptées au froid), d'autres, les mésophiles, à des températures moyennes (10–30 °C) ; enfin, certaines souches, dites thermophiles ou hyperthermophiles, se développent aux alentours de 60 °C et 100 °C respectivement (Van den Burg, 2003).

La plupart des bactéries de ces écosystèmes sont des *Archaea*. Mais on peut trouver des bactéries de type sulfo-oxydantes (*Beggiatoa*, *Pyrodictium*, *Thermococcus*, *Pyrococcus*, *Thiothrix*) (Larkin *et al.*, 1983), des bactéries sulfatoréductrices (*Archaeoglobus*), des bactéries méthanogènes (*Methanococcus*) (Bartlett *et al.*, 1995) et quelques autres ayant des actions nitrifiantes et dénitrifiantes.

Ces micro-organismes présentent diverses caractéristiques spécifiques concernant notamment l'ARN ribosomal, les lipides, l'architecture membranaires et l'ADN, qui diffèrent de celles connues chez les autres organismes vivants procaryotes et eucaryotes (Minic *et al.*, 2006).

### 1.2.3.2. Adaptation aux hautes températures

De nombreuses *Bactéria* et *Archaea* thermophiles et hyperthermophiles vivent au contact et même à l'intérieur des sources hydrothermales à des températures pouvant excéder 100 °C. L'adaptation de ces micro-organismes implique de nombreuses modifications de leurs composants qui doivent résister et fonctionner à ces températures. Cette adaptation moléculaire a été examinée au niveau des protéines et enzymes, ainsi qu'à celui des membranes et des acides nucléiques (**Minic et al., 2006**).

La stabilisation des protéines résulte de modifications souvent nombreuses dont la panoplie diffère d'une protéine à l'autre (**Kumar et al., 2000**). Ces modifications incluent plusieurs phénomènes, parmi eux :

- l'augmentation du nombre d'acides aminés chargés et, ce qui en découle, du nombre de liaisons ioniques.
- l'accroissement de la taille et de la densité des noyaux hydrophobes de la protéine, ce qui résulte de l'augmentation de la taille des chaînes latérales des acides aminés hydrophobes qui constituent ces noyaux (substitutions gly→ala, ala→leu, val→ ileu).
- la diminution ou l'absence d'acides aminés dont la chaîne latérale est particulièrement sensible aux hautes températures (groupe amide de l'asparagine et de la glutamine, cystéine, tryptophane).

La nature et le nombre de ces modifications varient beaucoup d'une protéine à une autre, la structure de chacune d'elles déterminant les modifications à apporter. Ceci est illustré de manière significative chez *Bacillus stearothermophilus* (**Minic et al., 2006**).

La stabilisation des membranes cytoplasmiques résulte de modifications qui s'accompagnent de la formation de liaisons covalentes entre les deux couches lipidiques (**De Rosa et al., 1991**).

En ce qui concerne l'ADN, l'adaptation aux hautes températures semble être associée à un contenu plus élevé en paires G+C, à un taux plus élevé de super-enroulement et d'interaction avec des protéines basiques (**Vinogradov, 2003**).



### 1.2.3.3. Importance biotechnologique des études des microorganismes des sources hydrothermales

Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles sont des éléments très importants et très utilisés dans plusieurs applications biotechnologiques. En outre, des cultures des hyperthermophiles viables peuvent être employées directement dans des processus techniques (**Huber, 1998**), car ils ont des capacités de produire des différentes molécules de nature diverse qui sont utilisés dans plusieurs procédés industrielles.

Dans les procédés industriels, les enzymes jouent un rôle de plus en plus important. Ces procédés mettent souvent en jeu des conditions physico-chimiques (température, pression, pH, etc.) incompatibles avec l'instabilité des enzymes provenant des organismes mésophiles. Les enzymes des bactéries vivant au contact des sources hydrothermales, adaptées aux hautes températures et à la pression, présentent un intérêt potentiel pour les usages industriels (**Minic *et al.*, 2006**).

Certains composants polymériques présentent également un intérêt biotechnologique. C'est le cas des exopolysaccharides (EPS) microbiens. Les bactéries des sources hydrothermales sont capables de synthétiser ces EPS et devraient contribuer à ces développements (**Guezennec, 2002**).

Divers agents anticancéreux actifs proviennent des micro-organismes terrestres. Récemment, plusieurs nouveaux agents anticancéreux d'origine marine ont fait l'objet d'essais précliniques et cliniques (**Schwartzmann *et al.*, 2001**). Ces potentialités pourraient s'étendre aux microorganismes des sources hydrothermales.

## II. Le genre *Bacillus*

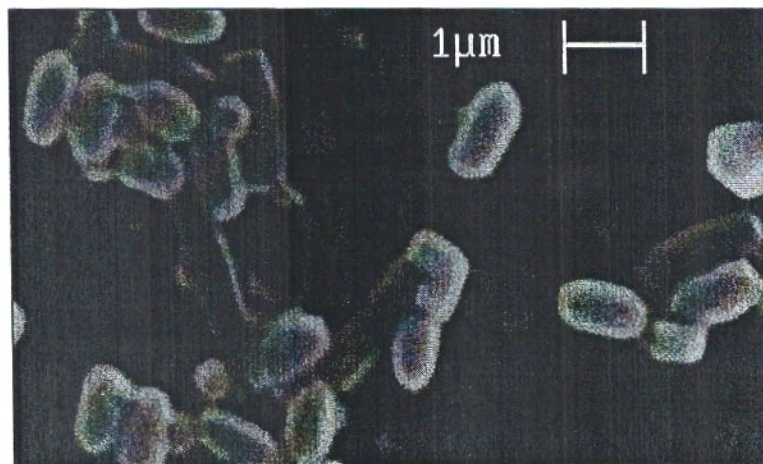
### 2.1. Caractéristiques des *Bacillus*

Les *Bacillus* sont des bactéries de large collection, Réparties sous différents climats et dans diverses régions du globe terrestre. Elles ont pu être isolées de sources thermales, de sillons montagneux de la région antarctique, de sources sulfureuses, de désert, de produit alimentaires, de canalisation d'eau chaude et de glacier arctiques, elles ont également isolées à partir du sol (Filali *et al.*, 1997).

Le genre *Bacillus* inclut les bactéries thermophiles et psychrophiles, acidophiles et alcalophiles, et les halophiles, la nature dépend de milieu de développement. (Nazina *et al.*, 2001).

En bactériologie, *Bacillus* appartient à la famille des bacillacées (bacillaceae), à l'ordre des bacillales (bacillales), à la classe des bacilles (bacilli), au phylum des firmicutes (firmicutes).

Les *Bacillus* désigne un genre de bactéries qui comprend différents bacilles aérobie et aéro-anaérobies facultatifs, à gram positif, sous formes des bâtonnés (Voir figure 02). Elles possèdent la capacité de produire, synthétiser des spores (élément ayant la forme d'une petite sphère dont la paroi est épaisse) qui vont permettre de résister à des conditions extrêmes.



**Figure 2** : aspect microscopique d'une souche du *Bacillus* 4-1T (Gugliandolo *et al.*, 2003)

## 2.2. Nomenclature des rangs taxonomiques

### 2.2.1. Le domaine des Eubactéries

Les bactéries du genre *Bacillus* font partie du domaine des bactéries ou eubactéries (ou Eubactria) et du phylum des Firmicutes (**Euzéby, 2002**). Elles sont aussi dénommés bactéries à bas G+C %, ce qui correspond à une branche des bactéries (figure 03).

### 2.2.2. Phylum des Firmicutes

Les bactéries du genre *Bacillus* font partie du *phylum* des Firmicutes. La nomenclature phylogénétique de certaines bactéries à bas G+C % et à coloration de gram positif.

### 2.2.3. La classe des Bacilli

Les Firmicutes comprennent cinq classes : les *Bacilli*, les *Clostridia*, les *Clostridia* non classées, la classe des Mollicutes et la classe des *Thermolithobacteria* (**Euzéby, 2002**).

Les *Bacilli* comprennent deux ordres, l'ordre des Bacillales et l'ordre des Lactobacillales.

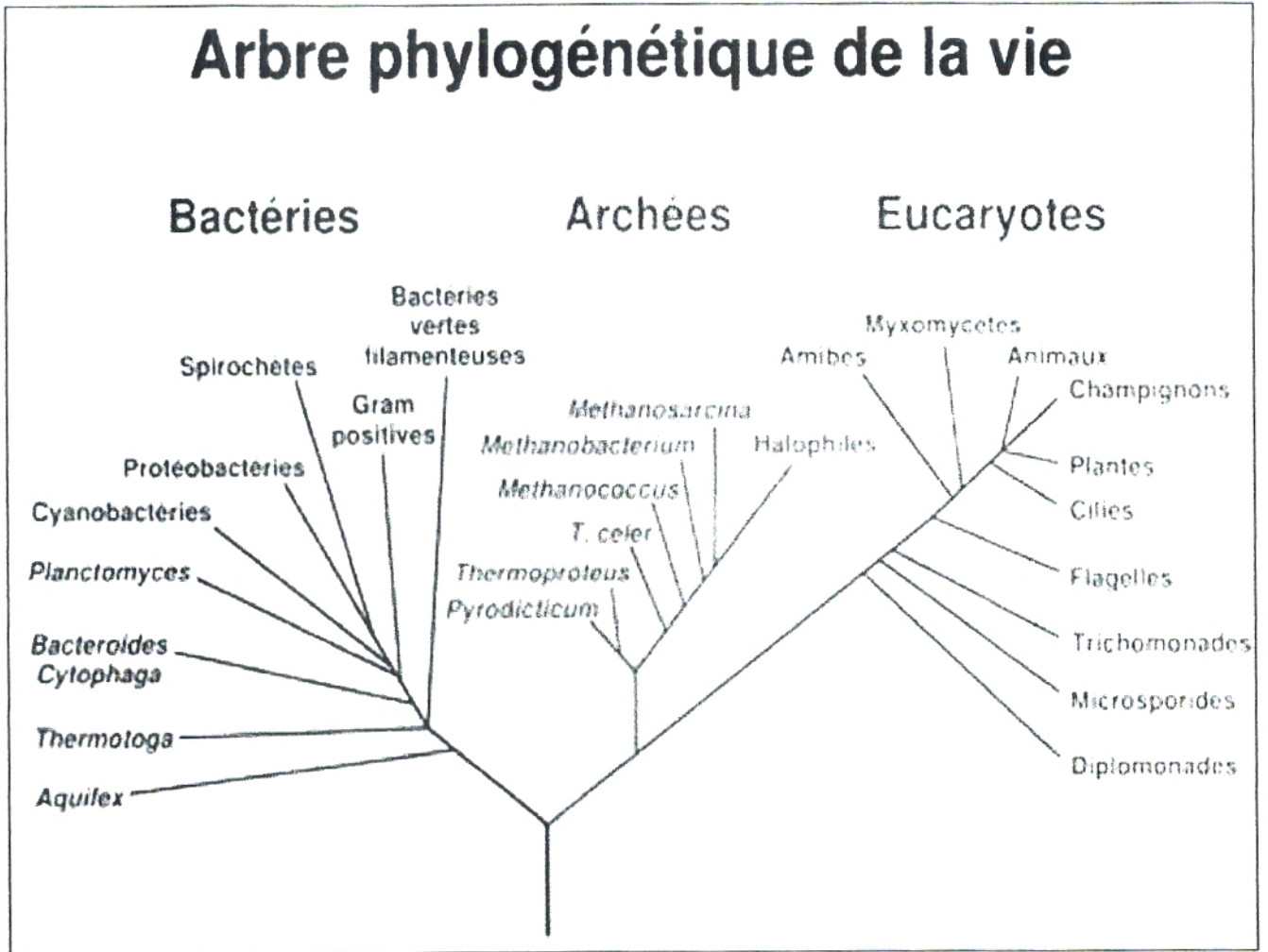


Figure 3 : Représentation schématique d'arbre phylogénétique (Woese *et al*, 1990).



## 2.2.4. L'ordre des bacillales

L'ordre des Bacillales comprend une dizaine de familles, comme on peut le lire dans le tableau 2.

**Tableau 2** : Composition de l'ordre des Bacillales (Larpent, 2000 ;Euzéby, 2002 ).

<p style="text-align: center;"><b>Famille des bacillaceae</b></p> <p><i>Alkalibacillus</i>      <i>Oceanobacillus</i>  <i>Amphibacillus</i>    <i>Ornithinibacillus</i>  <i>Anoxybacillus</i>    <i>Paraliobacillus</i>  <i>Bacillus</i>            <i>Paucisalibacillus</i>  <i>Caldalkalibacillus</i> <i>Pelagibacillus</i>  <i>Cerasibacillus</i>    <i>Piscibacillus</i>  <i>Exiguobacterium</i> <i>Pontibacillus</i>  <i>Filobacillus</i>        <i>Saccharococcus</i>  <i>Geobacillus</i>        <i>Salibacillus</i>  <i>Gracilibacillus</i>    <i>Salinibacillus</i>  <i>Halalkalibacillus</i> <i>Salirhabdus</i>  <i>Halobacillus</i>        <i>Tenuibacillus</i>  <i>Halolactibacillus</i> <i>Terribacillus</i>  <i>Jeotgalibacillus</i>    <i>Thalassobacillus</i>  <i>Lentibacillus</i>        <i>Ureibacillus</i>  <i>Lysinibacillus</i>    <i>Virgibacillus</i>  <i>Marinibacillus</i>    <i>Vulcanibacillus</i></p>	<p style="text-align: center;"><b>Famille Des planococcaceae</b></p> <p><i>Filibacter</i>  <i>Kurthia</i>  <i>Planococcus</i>  <i>Planomicrobium</i>  <i>Sporosarcina</i></p> <p style="text-align: center;"><b>Famille des Staphylococcaceae</b></p> <p><i>Gemella</i>  <i>Jeotgalicoccus</i>  <i>Macrococcus</i>  <i>Salinicoccus</i>  <i>Staphylococcus</i></p>	<p style="text-align: center;"><b>Famille des Thermoactinomycetaceae</b></p> <p><i>Laceyella</i>  <i>Mechercharimyces</i>  <i>Planifilum</i>  <i>Seinonella</i>  <i>Thermoactinomyces</i>  <i>Thermoflavimicrobium</i></p>	
<p style="text-align: center;"><b>Famille Des listeriaceae</b></p> <p><i>Brochothrix</i>  <i>Listeria</i></p>	<p style="text-align: center;"><b>Famille des Paenibacillaceae</b></p> <p><i>Ammoniphilus</i>  <i>Aneurinibacillus</i>  <i>Brevibacillus</i>  <i>Cohnella</i>  <i>Oxalophagus</i>  <i>Paenibacillus</i>  <i>Thermicanus</i>  <i>Thermobacillus</i></p>	<p style="text-align: center;"><b>Famille des Thermoactinomyetaceae</b></p> <p><i>Laceyella</i>  <i>Mechercharimyces</i>  <i>Planifilum</i>  <i>Seinonella</i>  <i>Thermoactinomyces</i></p> <p style="text-align: center;"><b>Famille des Turicibacteraceae</b></p> <p><i>Turicibacter</i></p> <p style="text-align: center;"><b>Famille des Sporolactobacillaceae</b></p> <p><i>Marinococcus</i>  <i>Sinococcus</i>  <i>Sporolactobacillus</i>  <i>Tuberibacillus</i></p>	
	<p style="text-align: center;">Non classées</p> <p><i>Paenibacillus</i></p>		

### 2.2.5. Le genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est un genre bactérien particulièrement hétérogène.

L'hétérogénéité extrême du genre est reflétée par la grande variété de places écologiques que les nombreuses espèces occupent, et par l'extrême diversité de leurs statuts taxonomiques.

Les dimensions de cellules végétatives vont de 0.5  $\mu\text{m}$  par 1.2  $\mu\text{m}$  à 2.5  $\mu\text{m}$  par 10  $\mu\text{m}$  de diamètre (**De Vos *et al.*, 2009**).

La teneur en G+C de l'ADN des espèces peut varier de 32 à 69 %, ce qui est beaucoup plus large que ce que l'on considère comme raisonnable pour la définition d'un genre (**TSCA, 1997**). Les taxons du genre *Bacillus* sont représentés dans le tableau 3.



**Tableau 3** : Taxons de la famille des *Bacillaceae* appartenant au genre *Bacillus* (Larpent, 2000).

<i>Bacillus agaradhaerens</i>	<i>Bacillus lentus</i>	<i>Bacillus halmapatu</i>
<i>Bacillus alcalophilus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus marinus</i>	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus marismortii</i>	<i>Bacillus haloalkaliphilus</i>
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus halodenitrificans</i>
<i>Bacillus azotoformans</i>	<i>Bacillus methanolicus</i>	<i>Bacillus halodurans</i>
<i>Bacillus badius</i>	<i>Bacillus moiavensis</i>	<i>Bacillus thermoglucosidasius</i>
<i>Bacillus benzoovorans</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillus thermocloacae</i>
<i>Bacillus carboniphilus</i>	<i>Bacillus naganoensis</i>	<i>Bacillus thermocatentilatus</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus macini</i>	<i>Bacillus horikoshii</i>
<i>Bacillus chinensi</i>	<i>Bacillus oleronius</i>	<i>Bacillus infernus</i>
<i>Bacillus chitinolyticus</i>	<i>Bacillus pallidus</i>	<i>Bacillus insolitus</i>
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus pasteurii</i>	<i>Bacillus kaustophilus</i>
<i>Bacillus clarkii</i>	<i>Bacillus popilliae</i>	<i>Bacillus kobensis</i>
<i>Bacillus clausii</i>	<i>Bacillus pseudalcaliphilus</i>	<i>Bacillus laevolacticus</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus pseudofirmus</i>	<i>Bacillus lentimorbus</i>
<i>Bacillus cohnii</i>	<i>Bacillus pseudomycoides</i>	<i>Bacillus thermosphaericus</i>
<i>Bacillus curdlunolyticus</i>	<i>Bacillus psychrophilus</i>	<i>Bacillus thermoruber</i>
<i>Bacillus dipsosauri</i>	<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bacillus ehimensis</i>	<i>Bacillus pulvifaciens</i>	<i>Bacillus tusciae</i>
<i>Bacillus fastidiosus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus halophilus</i>
<i>Bacillus firmus</i>	<i>Bacillus schlegelii</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
<i>Bacillus flexus</i>	<i>Bacillus silvestris</i>	<i>Bacillus glucanolyticus</i>
<i>Bacillus fusiformis</i>	<i>Bacillus simplex</i>	<i>Bacillus thermolcovorans</i>
<i>Bacillus galactophilus</i>	<i>Bacillus smithii</i>	<i>Bacillus vallismortis</i>
<i>Bacillus gibsonii</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Bacillus yedderi</i>
<i>Bacillus globisporus</i>	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>





### III. Biotechnologie des *Bacillus* ✎

#### 3.1. Utilisation des *Bacillus* en biotechnologie

Les espèces de *Bacillus* sont encore et toujours les usines bactériennes dominantes dans les fermentations microbiennes. *Bacillus subtilis* est un participant microbien clé de la production actuelle de la fermentation traditionnelle du soya (Schallmey *et al* ,2004) et beaucoup d'autres espèces du genre *Bacillus* sont utilisées dans plusieurs domaines de production industrielle.

Les souches de *Bacillus* ont une capacité de produire et sécréter des différents biomolécules et en grande quantité tels que les enzymes extracellulaires, les antibiotiques, les polysaccharides et d'autres molécules de nature diverse.

Ces bactéries détiennent des secrets qui laissent rêveurs. Des secrets aux enjeux professionnels, médicaux et scientifiques. En effet les *Bacillus* hyperthermophiles permettent d'entrevoir d'innombrables applications dans des domaines parfois très lointains.

Les espèces de *Bacillus* sont destinées à devenir les hôtes privilégiés pour la production de plusieurs produits nouveaux ou améliorés, au fur et à mesure que nous progressons au travers de l'ère de la génomique et de la protéomique (Schallmey *et al.*, 2004).

### 3.1.1. Les activités enzymatiques du *Bacillus* thermophiles et hyperthermophiles

Les avantages que rapporte la conduite des processus industriels à températures élevées (solubilité des substrats augmentée, viscosité diminuée, disponibilité biologique importante, vitesses de transfert et de réaction plus élevées, risque de contamination microbienne diminué, etc.) ont poussé les recherches vers l'exploitation des enzymes des thermophiles et hyperthermophiles. En effet, les *Bacillus* thermophiles et hyperthermophiles constituent une source d'enzymes supérieures aux biocatalyseurs traditionnels par leurs propriétés uniques : thermostables, thermoactives, actives en présence des solvants organiques (jusqu'à 99%), résistantes aux agents protéolytiques et aux valeurs extrêmes de pH (**Egorova et Antranikian, 2005**).

Il ya plusieurs enzymes sécrétés par les différents espèces du genre *Bacillus* isolés à partir des sources thermales :

- Amylase par *Bacillus* sp. HUTBS71 (**Al-Quadani et al., 2009 ; Fooladj et al., 2010**).
- Protéase par *Bacillus* sp. MLA64 et HUTBS71 (**Akel et al., 2009 ; Lagzian et al., 2012**).
- Cellulase par *Bacillus* sp. CH43 et HR68 (**Mawadza et al., 2000**).
- Chitinase par *Bacillus* sp. 13.26 (**Yuli et al., 2004**).
- Lipase par *Bacillus thermoleovorans* CCR11 (**Castro-Ochoa et al., 2005**).

### 3.1.2. Production des antibiotiques par les *Bacillus*

Les métabolites secondaires produits par les microorganismes représentent une large source de composés d'une diversité structurale très vaste et des milliers d'entre eux sont doués d'un potentiel d'activité biologique très important (**Zerizer et al., 2006**).

Depuis l'avènement des antibiotiques, une nette amélioration de la qualité et de la durée de vie a été constatée. Cependant leur utilisation intensive a eu pour conséquence l'adaptation des bactéries à ces remarquables substances. En effet, ces dernières années ont été marquées par une augmentation inquiétante de la multirésistance de bactéries pathogènes, la résurgence de maladies infectieuses que l'on croyait parfaitement maîtrisées et l'émergence de nouveaux pathogènes et ceci particulièrement dans les pays en voie de développement. Ces constats expliquent l'urgence de disposer de nouvelles molécules antibiotiques. Les actinomycètes, bactéries à Gram positif, représentent la principale source naturelle de métabolites anticellulaires (**Boughachiche et al., 2005**).

Parmi les bactéries productrices d'antibiotiques, les *Bacillus* ont la capacité de produire plusieurs classes d'antibiotiques (Tableau 4).

Les antibiotiques sécrétés par les *Bacillus* sont généralement produits au stade précoce de la sporulation (**Schallmey et al., 2004**). On peut citer par exemple, *Bacillus brevis* produit deux antibiotiques (Gramicidine et Tyrocidine) au début de la phase de croissance stationnaire. *Bacillus subtilis* synthétise également plusieurs antibiotiques comme : Subtiline, Bacilysine, Rhizocitine... .

Les antibiotiques semi-synthétiques sont devenus de plus en plus importants dans l'industrie des antibiotiques en raison de l'augmentation de la résistance des bactéries pathogènes vers les antibiotiques traditionnels par exemple, le  $\beta$ -lactamine comme la pénicilline ou céphalosporine. En cassant le cycle de  $\beta$ -lactam la production des antibiotiques modifiés ouvre beaucoup de possibilités pour changer l'effet sur ces bactéries résistantes. Une manière simple pour effectuer cette modification c'est l'utilisation des  $\beta$ -lactamase de *Bacillus cereus* ou *Bacillus megaterium* (**Schallmey et al., 2004**).



Tableau 4 : Quelques antibiotiques synthétisés par *Bacillus.Sp* (Schallmey et al., 2004)

Classe	Antibiotiques	Fonctions	<i>Bacillus .sp</i>
Oligopeptides cycliques	Bacitracine	Inhiber la synthèse de la paroi cellulaire	<i>Bacillus licheniformis</i>
	Gramicidine et tyrocidine		<i>Bacillus brevis</i>
Oligopeptides cycliques ou linéaires	Polymixine		<i>Bacillus polymyxa</i>
	Colistine	Interférer la fonction de la membrane	<i>Bacillus colistinus</i>
	Circuline		<i>Bacillus circulans</i>
Peptides de base	Edeine	Empêcher la formation du complexe d'initiation sur la sous unité de petit ribosome	<i>Bacillus brevis</i>
	Butirosine	Affect la fonction du ribosome	<i>Bacillus circulans</i>
Antibiotiques d'aminosides			

### 3.2. Méthodes de screening des métabolites secondaires

Plusieurs stratégies sont disponibles pour le screening (criblage) de métabolites secondaires surtout les substances antimicrobiennes.

L'efficacité d'un programme de criblage dépendra de trois critères essentiels :

- Choix des organismes producteurs
- Choix des cibles recherchées
- Choix des méthodes analytiques.

#### 3.2.1. Screening primaire

Le screening primaire consiste à tester *in vitro* l'activité antimicrobienne des microorganismes ciblés sur milieu solide contre des germes tests. Après, la présence de la zone d'inhibition après incubation indique la présence d'effet inhibiteur (**Eccleston *et al.*, 2008**).

#### 3.2.2. Screening secondaire

Le screening secondaire suit toujours le criblage primaire, son objectif est d'obtenir une production en culture liquide et examiner les activités dans une série de tests complémentaires *in vitro* et/ou *in vivo*.

Plusieurs techniques sont utilisées pour la caractérisation des molécules bioactives :

- Méthodes chromatographiques.
- Méthodes physico-chimique (ultraviolet, infrarouge...).

Actuellement, les stratégies de screening moderne emploient des différentes disciplines pour une production optimisée des métabolites. Ainsi, il y a une approche écologique et génétique pour les microorganismes producteurs (**Khelil Klouche, 1998**).

# **MATERIELS ET METHODES**

---



## Matériels et méthodes

## 1. Le site d'étude « Hammam Debagh (Meskoutine) –Guelma- »

Les échantillons d'eau ont été prélevés à partir de la source thermale (Hammam Debagh) située dans le Wilaya de Guelma (Nord-Est Algérien) (Figure 4).

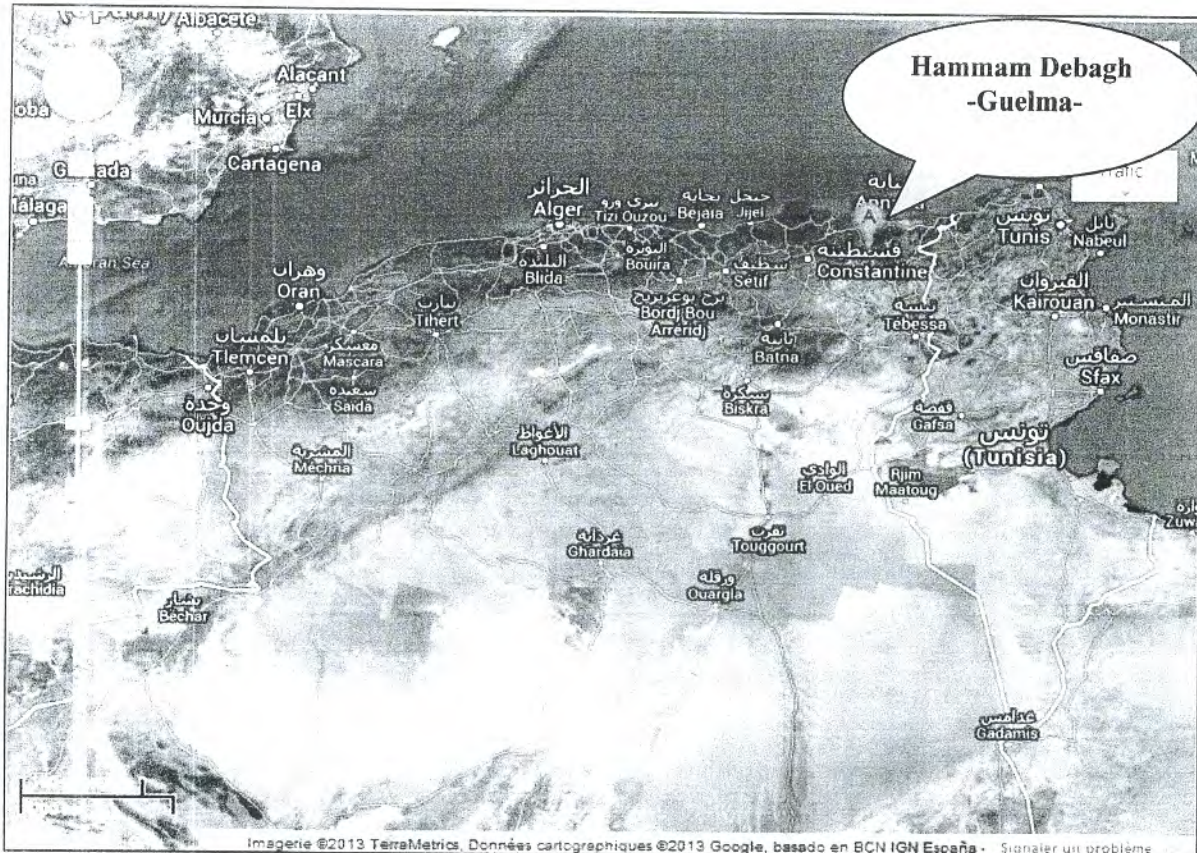


Figure 4 : Localisation de site d'étude : Hammam Debagh –Guelma- (Google Earth)

Le site d'étude se localise à l'Est Constantinois, à 20 Km du chef-lieu de la Wilaya Guelma, Il se retrouve à 320 mètres d'altitude surprenant des collines et montagnes boisées.

La source de Hammam Debagh est la plus florissante de l'Algérie et ses eaux sont les plus chaudes. Elle contient neuf sources hyperthermales d'origine volcanique dont la température de l'eau varie entre 90 et 98°C (OUALI, 2008).

Le but de notre travail vise le screening de la microflore extrêmophile en particulier les bacilles à Gram positif qu'héberge ce milieu extrême en vue d'exploitation biotechnologique (activité antimicrobienne).

## 2. Données physico-chimique de la source thermale

Dans le souci de mieux connaître cette flore particulière, il nous a paru nécessaire de connaître quelques caractéristiques physico-chimiques du lieu de prélèvement : Hammam Debagh (Meskhoutine).

L'eau est de nature saline, avec une odeur sulfureuse, son faciès chimique est bicarbonaté calciques, chloruré sodique, radioactives, avec dégagement d'hydrogène sulfuré (Tableau 5).

## 3. Prélèvement d'échantillons

Les échantillons d'eaux ont été prélevés en mars 2013 à partir d'un griffon (B) de sources thermales de Hammam Debagh à une profondeur de 10 à 20cm de la surface par des flacons stériles.

Des mesures *in situ* de la température et du pH sont réalisées, respectivement à l'aide d'un thermomètre à mercure et des bandelettes de pH (Figure 5). Les prélèvements sont transportés au laboratoire à une température ambiante.

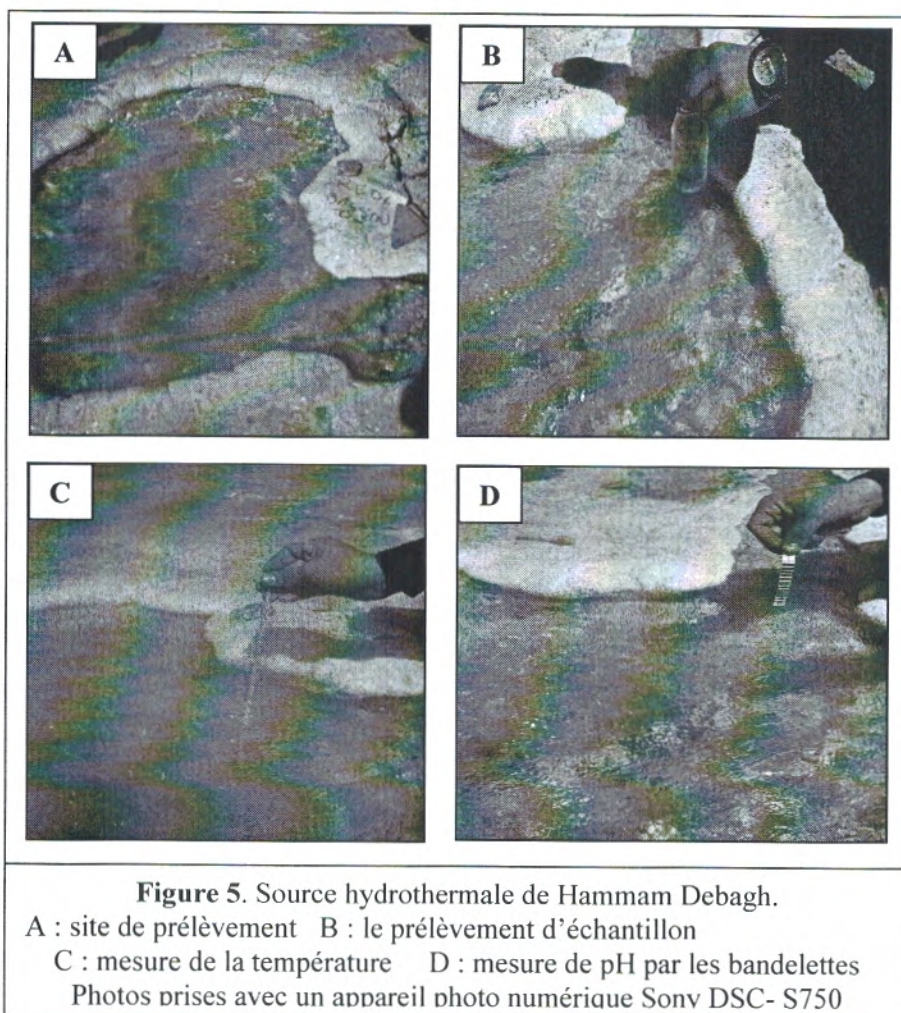
**Tableau 5 :** Caractéristiques physico-chimiques de la source chaude (Bassin B) (Yakhlef *et al.*, 2012).

Hammam Debagh	
Location	36°27'N/07°16'E
T (°C)	95*
pH	7.3
Débit (L/s)	1650
Ca	130 mg/l
Mg <sup>2+</sup>	37.4 mg/l
K <sup>+</sup>	46 mg/l
Na <sup>+</sup>	240 mg/l
Cl <sup>-</sup>	370 mg/l
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	385 mg/l
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	183 mg/l
H <sub>2</sub> S	6.80 mg/l
As	0.45 mg/l

\* : mesuré *in situ*

Toute la partie expérimentale a été effectuée au niveau du laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (L.A.M.A.A.B.E), université Abou Bekr Belkaid - Tlemcen.





#### 4. Isolement et purification des isolats

Le milieu bouillon nutritif a été utilisé pour le criblage des souches.

1 ml d'échantillon d'eau est inoculé dans 9 ml du bouillon nutritif. L'incubation est effectuée à 65°C jusqu'à l'apparition de trouble (6 à 9 jours). Un examen microscopique a été réalisé par la suite.

Après, 1 ml du bouillon est ensemencé en profondeur sur la gélose nutritive. Les boîtes sont incubées à 55°C jusqu'à l'apparition des colonies (3 à 5 jours).

Les colonies à différents aspects macroscopiques sont sélectionnées, purifiées par repiquage successifs sur les mêmes milieux d'isolements.

## 5. Conservation des isolats

Les souches de 24h présentant une forme bâtonnet à Gram positif pures et qui forment des spores, sont conservées d'une part à 4°C en gélose inclinée, et d'autre part à -18°C en suspension, en présence de glycérol à 15% (v/v).

## 6. Détermination des caractéristiques phénotypiques

Selon les tests proposés par (Logan *et al.*, 2009) pour la description de nouveaux taxons dans l'ordre des *Bacillales*, Les souches pures sont soumises à une étude des différents caractères morphologiques, culturels et biochimiques dans le but de leur identification jusqu'au genre.

### 6.1. Caractéristiques morphologiques et culturelles.

#### 6.1.1. Examen à l'état frais

Il permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie, de leur mode de regroupement et de leur mobilité éventuelle (Girard et Rougieux, 1967). L'examen des bactéries à l'état frais se fait entre lame et lamelle. Il est conseillé d'examiner des cultures jeunes.

#### 6.1.2. Coloration par bleu de méthylène

Cette technique permet la mise en évidence des endospores dans le corps bactérien à partir des cultures de 72h, par coloration après fixation avec une solution de bleu de méthylène pendant 1 minute (Harley et prescott, 2002).

#### 6.1.3. Coloration de Gram

Cette coloration différentielle, découverte par Hans Christian Joachim Gram en 1884 permet de mettre en évidence les propriétés structurales de la paroi bactérienne.

La coloration de Gram permet donc de diviser le monde des bactéries en deux groupes distincts bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif. Toutes les observations sont effectuées par un microscope photonique (Zeiss West Germany).



## 6.2. Caractéristiques biochimiques

### 6.2.1. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage.

Déposer sur une lame stérile une goutte de suspension épaisse de culture jeune puis déposer sur cette préparation, une goutte d'eau oxygénée (environ 5 volumes) (**Girard et Rougieux, 1967**). La présence de la catalase se traduit par un dégagement immédiat de bulles gazeuses.

### 6.2.2. Test mannitol – mobilité

La mobilité des souches ainsi que la fermentation du mannitol sont étudiées sur le milieu semi-solide mannitol mobilité. La mobilité de l'isolat est interprétée par un envahissement du milieu à partir de la pique d'inoculation et la fermentation du mannitol est traduite par un virage au jaune du milieu de culture (**Harley et prescott, 2002**).

### 6.2.3. Mise en évidence de type respiratoire

La mise en évidence expérimentale de type respiratoire est réalisée sur la gélose viande foie.

L'ensemencement de milieu par la souche se fait par transportation d'inoculum dans le fond du tube, puis remonter et descendre la pipette en exécutant un mouvement de vrille à plusieurs reprises.

Les bactéries aérobies strictes se développent uniquement dans la zone superficielle, tandis que les aéro-anaérobies facultatives se développent sur la totalité du tube (**Girard et Rougieux, 1967**).



#### 6.2.4. Plaque api 20<sup>E</sup>

La galerie api 20<sup>E</sup> comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec les suspensions bactériennes effectuées à partir des cultures de 24h.

Après incubation de 24h à 37°C, les réactions se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions est faite à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique de la plaque (**Biomeriaux, 2006**).

### 7. Mise en évidence des enzymes extracellulaires

Les isolats sont soumis à une recherche de différents enzymes extracellulaires à 55°C pendant 1 à 2 jours.

#### 7.1. Détermination de l'activité amylolytique

La présence de l'activité amylolytique est déterminée par l'ensemencement des souches sur gélose à amidon (annexe). Après incubation, les colonies sont recouvertes par une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour des colonies, par contre les zones contenant de l'amidon se colorent en brun (**Fooladj et al., 2010**).

#### 7.2. Détermination de l'activité protéolytique

La dégradation de caséine est déterminée par l'ensemencement des souches sur gélose au lait (annexe). La présence de cette activité est détectée par la formation d'un halo clair autour des colonies (**Roxana et al., 2009**).

### 7.3. Détermination de l'activité lipolytique

#### 7.3.1. Hydrolyse de Tween 80

Cette activité est recherchée par l'ensemencement des souches sur milieu à base de tween 80 (annexe). Après incubation, le développement d'un précipité (zone opaque) autour des colonies témoigne la présence d'une lipase (**Gonzalez *et al.*, 1978**).

#### 7.3.2. Hydrolyse de la lécithine

Ce test est réalisé par l'ensemencement des souches sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œufs (annexe). Après incubation, l'apparition de zone claire autour des cultures démontre que les souches possèdent la lécithinase (**De Vos *et al.*, 2009**).

## 8. Screening primaire d'activités antimicrobiennes

### 8.1. Inocula des bactéries test

L'activité antimicrobienne des souches isolées est recherchée contre cinq germes de références (deux bactéries à Gram positif, deux bactéries à Gram négatif et une levure) (Tableau 06). Les souches de références sont fournies par les quatre équipes du laboratoire L.A.M.A.A.B.E –Tlemcen-.

**Tableau 6** : Germes test de référence utilisées

Germes test	Référence
<b>Bactéries à Gram positif</b>	
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<b>Bactéries à Gram négatif</b>	
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	ATCC 70603
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<b>Levure</b>	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

Chaque microorganisme test est inoculé dans l'eau physiologique stérile après une culture de 18h sur son milieu spécifique. Chaque suspension microbienne préparée est ajustée à une densité optique entre 0.08 et 0.1 (turbidité correspond à 0.5 Mc Farland).

### **8.2. Technique des cylindres d'agar (Eccleston *et al.*, 2008)**

Les souches isolées sont ensemencées en stries serrés avec écouvillon sur la gélose nutritive et incubées à 55°C pendant 72h pour obtenir un tapis.

Des cylindres d'agar d'environ 6mm de diamètre ont été prélevés à l'aide de l'extrémité plate d'une pipette pasteur stérile à partir de la GN et déposées sur la surface du Muller-Hinton et Sabouraud préalablement ensemencé par les germes test.

Les boites ont été posé à 4°C pendant 2 h à 4 h de manière à arrêter momentanément la croissance des bactéries et permettre la diffusion des antibiotiques puis incubées à 37°C pour les bactéries et à 25°C pour la levure pendant 24h. Ensuite les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés en (mm). Les zones d'inhibitions de 2 mm ou plus sont considéré comme résultat positif (Yakhlef *et al.*, 2012).

### **8.3. Technique des puits (Khulana *et al.*, 2012)**

Deux souches sont choisies pour tester leur activité antimicrobienne par la technique des puits.

Les souches sont ensemencées sur milieu liquide et incubé pendant 72h, ensuite le milieu subit une centrifugation (3000 tr pendant 40 min) pour écarter les cellules.

Sur le milieu Muller Hinton et Sabouraud ensemencé par les mêmes germes tests utilisés en avant, des puits sont creusées. Environ 50 µl de surnageant des cultures liquides est déposé dans chaque puits et incubées à 37°C pour les bactéries et 25°C pour la levure. Après 24h d'incubation les zones d'inhibition sont mesurées.



## Résultats et discussion

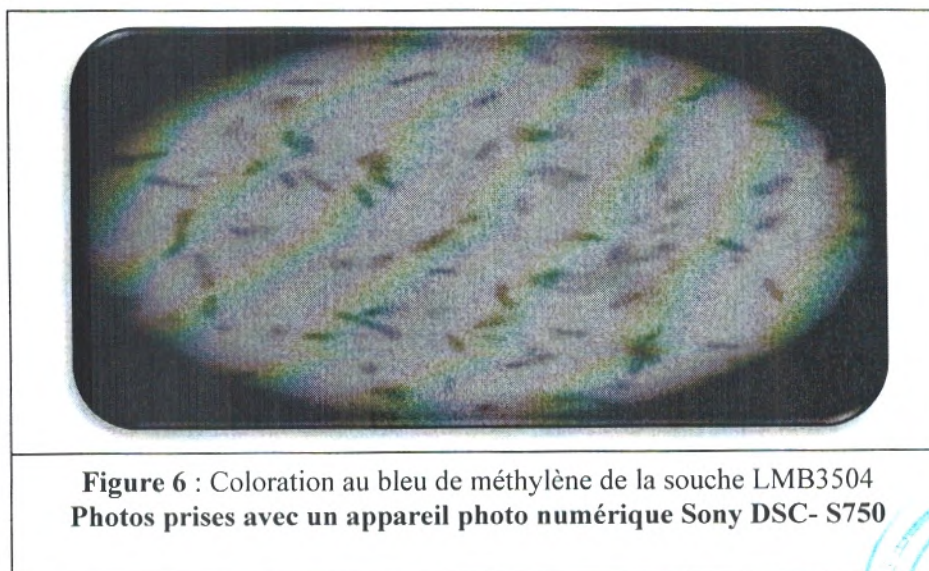
Le criblage des microorganismes thermophiles ou hyperthermophiles à partir d'échantillon d'eau a abouti à l'isolement de sept isolats de forme bâtonnet Gram positif, ils sont désignés selon un code composé de 3 lettres et 4 numéros : (LMB3501, LMB3502, LMB3503, LMB3504, LMB3505, LMB3506, LMB3507).

Les observations des premiers isolements ont montré une croissance un peu lente sur milieu liquide (6 jours à 65°C), par contre par la suite, les souches purifiées ont montré une meilleure croissance dans le milieu solide (colonies apparaissant après 18 à 24h d'incubation à 55°C).

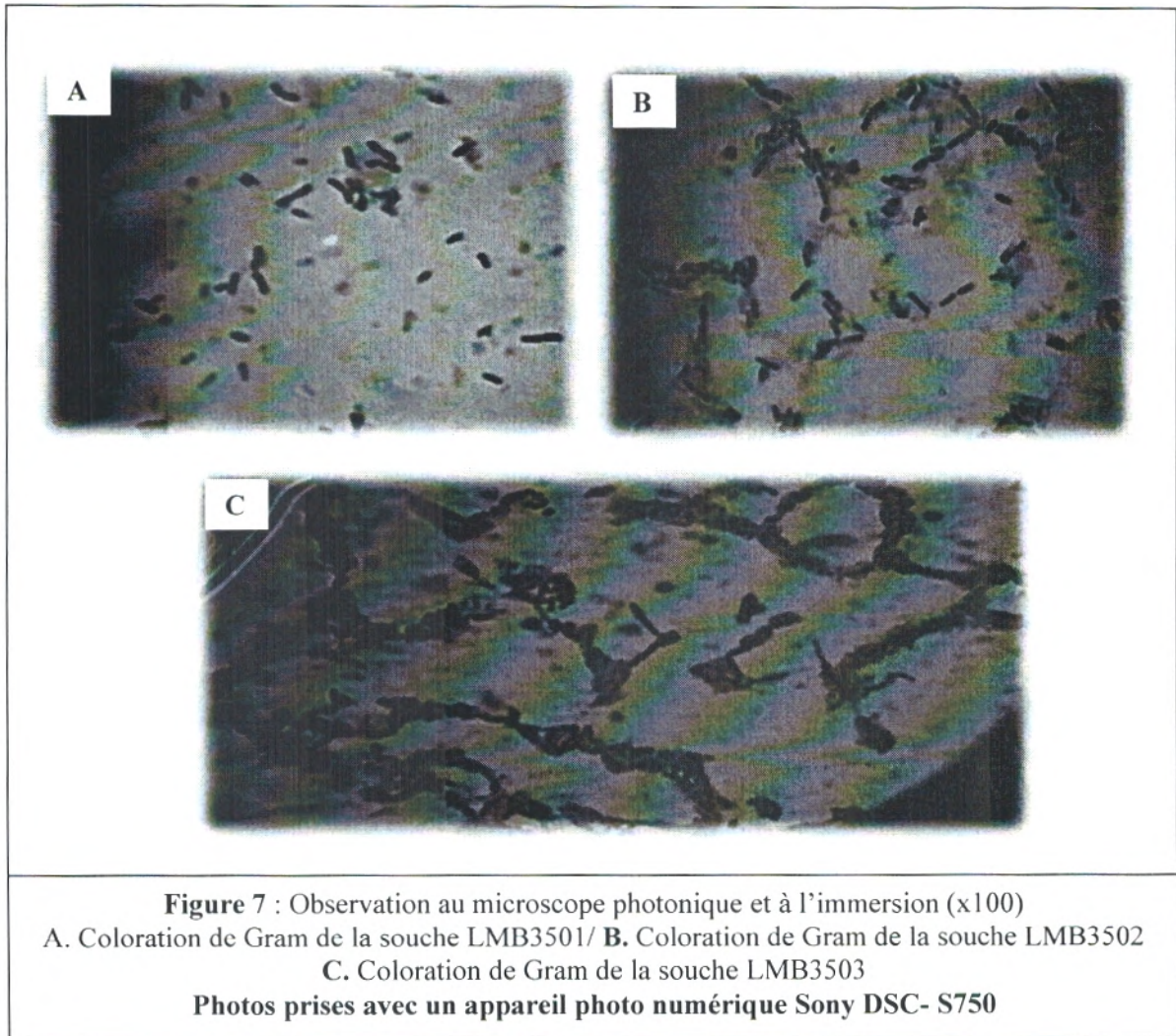
### 1. Détermination des caractéristiques phénotypiques

#### 1.1. Caractéristiques morphologiques

L'état frais des isolats a montré que 5 souches (LMB3502, LMB3504, LMB3505, LMB3506, LMB3507) sont des bacilles mobiles et 2 souches (LMB3501, LMB3503) sont des bacilles immobiles, ainsi que l'observation des cellules fixées après coloration par bleu de méthylène, montre également que les cellules se présentent sous forme des bâtonnets avec présence de spores en position terminale et sub-terminale (figure 6).



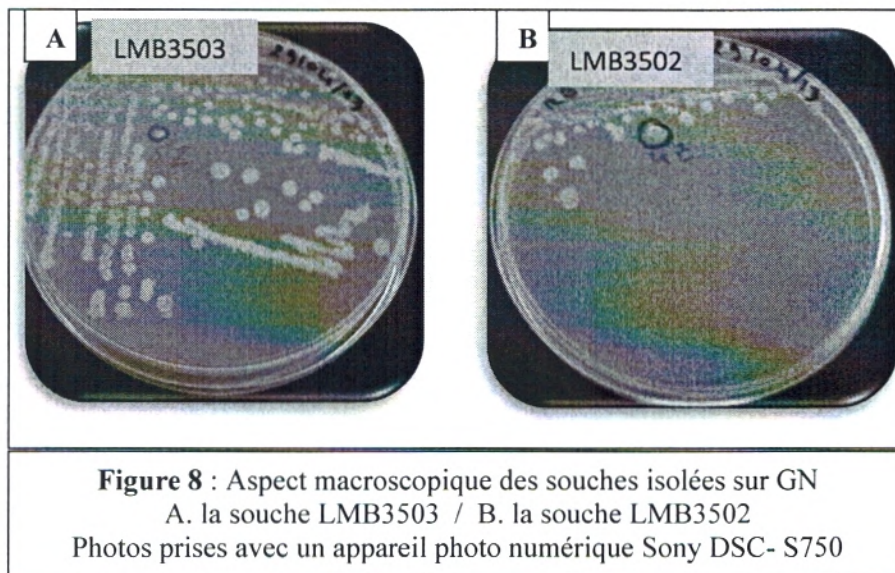
La coloration de Gram effectuée a révélé que les 7 souches sont des bacilles à Gram positif aux extrémités arrondies, isolés ou arrangés en chaîne ou en chaînette selon les souches (figure 7).





## 1.2. Caractéristiques culturelles

L'aspect macroscopique des souches sur GN à permis de dégager des colonies de plusieurs formes : lisse, visqueuse, bombé, de bord régulier et irrégulier de couleur crème (figure 8).



## 1.3. Caractéristiques biochimiques

### 1.3.1. Recherche de la catalase

Toutes les souches étudiées sont catalase positives.

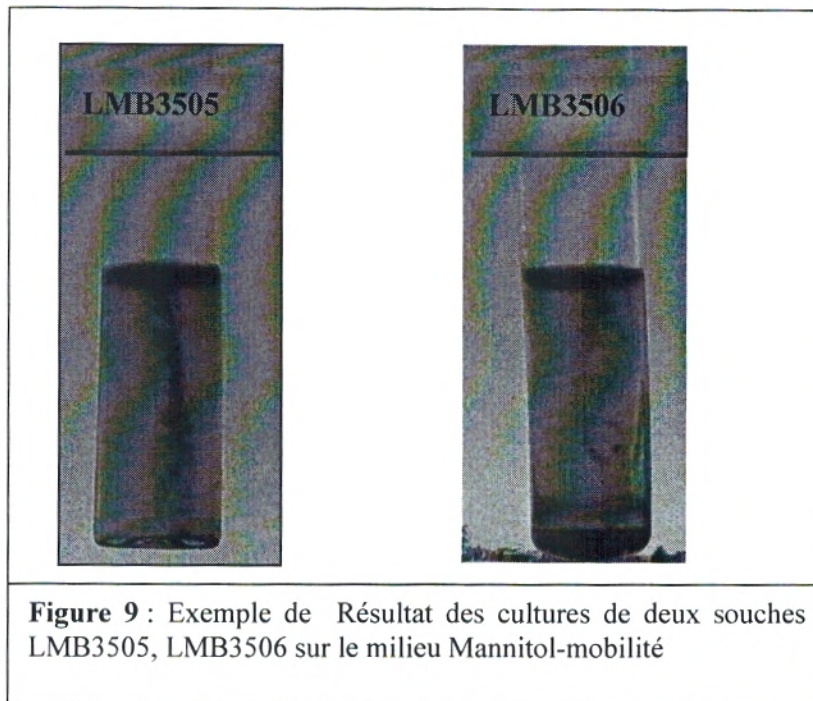
### 1.3.2. Test mannitol-mobilité

Un virage de l'indicateur au jaune a été observé, cela indique que les souches fermentent le mannitol (figure 9).

Tous les isolats sont mobiles sauf LMB3501 et LMB3503 qui sont immobile selon le mannitol-mobilité.







### 1.3.3. Mise en évidence de type respiratoire

Les cultures des souches sur le milieu VF montre que tous les isolats sont aérobies.

### 1.3.4. Plaque api 20<sup>E</sup>

Les tests biochimiques ont été réalisés par l'utilisation de la plaque api 20<sup>E</sup>. Les résultats des différents caractères biochimiques des souches par la galerie sont résumés dans le tableau 07.

Les souches possèdent la  $\beta$ -galactosidase, arginine Dihydrolase et la gélatinase par contre l'absence d'uréase, lysine Décarboxylase, ornithine Décarboxylase et tryptophane Désaminase et il y a pas production d'indole.

Tous les isolats sont incapables de dégrader le Glucose, Rhaminose, Saccharose, Melibiose, Amygdaline et Arabinose.

Toutes les souches étudiées n'ont pas la capacité de produire l'acétoïne.

Quarte souches ont utilisé le citrate comme source de carbone (LMB3501, LMB3502, LMB3504, LMB3506).

Tableau 7 : Caractérisation biochimique des isolats

souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	catalase	
LMB3501	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
LMB3502	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LMB3503	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LMB3504	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LMB3505	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LMB3506	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LMB3507	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

## 2. Mise en évidence des enzymes extracellulaires

La présence de ces activités hydrolytiques a été réalisée en utilisant les substrats, amidon, caséine, tween 80, et gélose à la lécithine (figure 10).

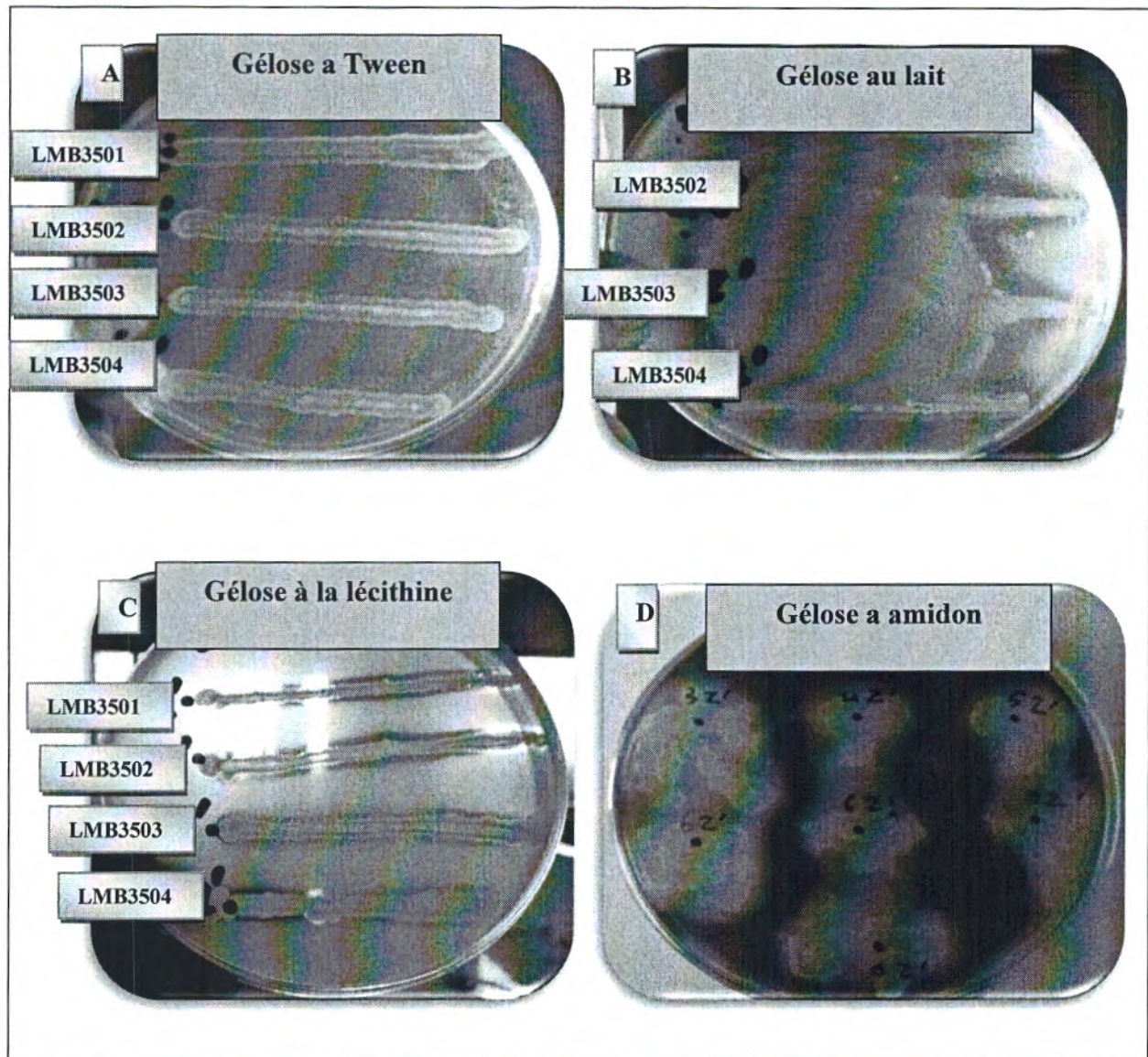
La production d'activités enzymatiques (amylolytique, lipolytique, protéolytique) a été observée chez tous les isolats étudiés (Tableau 08).

Toutes les souches ont hydrolysées l'amidon, tween 80, la lécithine et la caséine.

Tableau 8 : Résultats d'activités enzymatiques des isolats étudiées

souches	amidon	Tween 80	caséine	Lécithine
LMB3501	+	+	+	+
LMB3502	+	+	+	+
LMB3503	+	+	+	+
LMB3504	+	+	+	+
LMB3505	+	+	+	+
LMB3506	+	+	+	+
LMB3507	+	+	+	+





**Figure 10** : Exemples d'activités hydrolytiques détectées

A. Hydrolyse du tween 80 par LMB3501, LMB3502, LMB3503, LMB3504

B. hydrolyse de la caséine Par LMB3502, LMB3503, LMB3504

C. hydrolyse de la lécithine Par LMB3501, LMB3502, LMB3503, LMB3504

D. hydrolyse de l'amidon Par LMB3501, LMB3502, LMB3503, LMB3504, LMB3505, LMB3506, LMB3507.

Photos prises avec un appareil photo numérique Sony DSC- S750



### 3. Screening primaire d'activités antimicrobiennes

L'activité antimicrobienne des souches isolées et purifiées a été mise en évidence par deux techniques, la technique des cylindres d'agar et la technique des puits. Les deux techniques sont des méthodes de diffusion en milieu gélosé.

#### 3.1. Technique des cylindres d'agar

Le test d'activités antimicrobiennes des isolats par la technique des cylindres d'agar a révélé que la majorité des isolats présentent une activité antibactériennes sur, au moins, une des bactéries test.

- Les résultats obtenus sont résumés dans le (Tableau 09).

Les sept souches isolées agissent plus sur les bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC70603) sauf la souche LMB3503 n'a pas d'activité contre *Pseudomonas aeruginosa*. (Figure 11, 12, 13, 14).

Par contre l'ensemble des isolats ne présentent aucune activité vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 (figure 15).

Les deux souches LMB3504 et LMB3506 montrent une activité antibactérienne très importante contre la totalité des bactéries tests utilisés, surtout sur les bactéries Gram négatif et plus précisément contre *Pseudomonas aeruginosa* (zone d'inhibition de 20 mm est présentée par LMB3504 et LMB35002, 18 mm par LMB3505 et LMB3506, 15 mm par LMB 3501 et LMB 3507).

**Tableau 9** : Résultats de l'activité antimicrobienne des souches étudiées par la technique des cylindres d'agar

Germes Test	Diamètre de zone d'inhibition en (mm)						
	LMB3501	LMB3502	LMB3503	LMB3504	LMB3505	LMB3506	LMB3507
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.5	6.5	/	6.5	/	7	/
<i>Bacillus cereus</i>	/	/	8	7	/	7	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	20	/	20	18	18	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9.5	9.5	9.5	11	8.5	10	/
<i>Candida albicans</i>	/	/	/	/	/	/	/



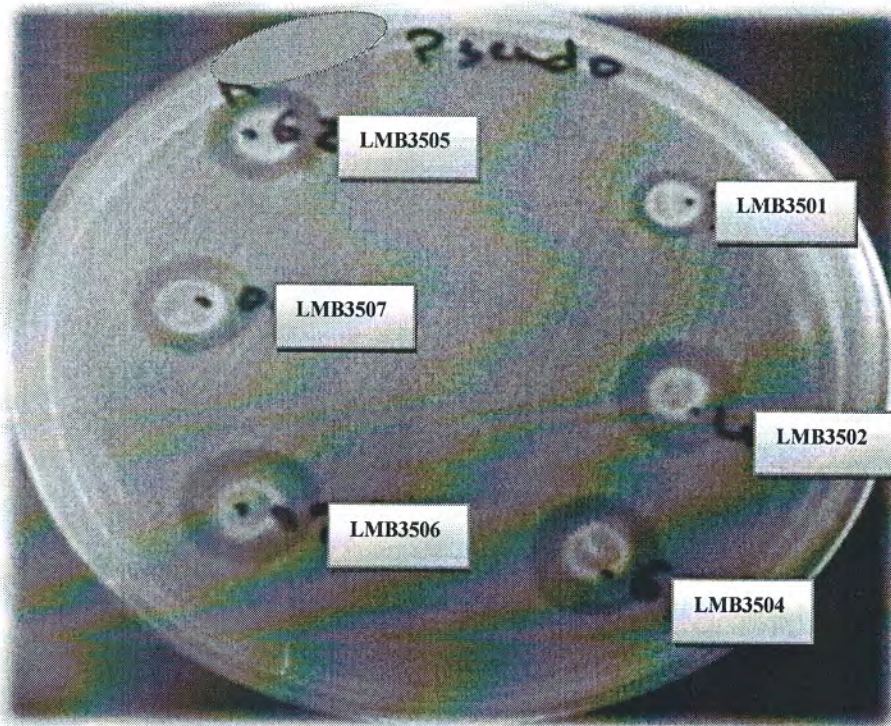


Figure 11 : Test d'activité antimicrobienne des souches étudiées vis-à-vis *pseudomonas aeruginosa*

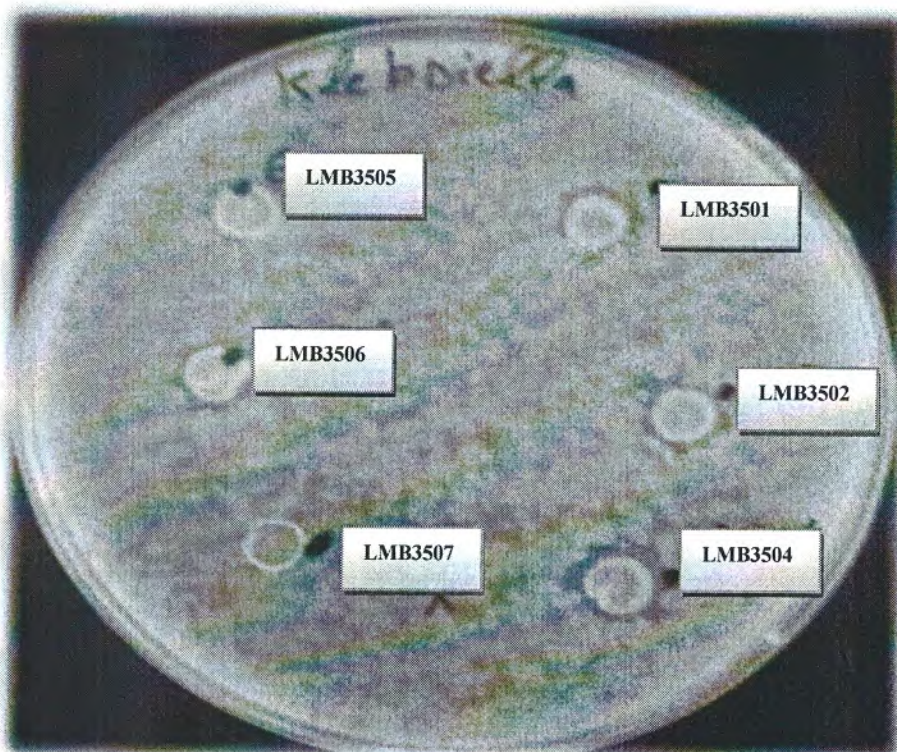
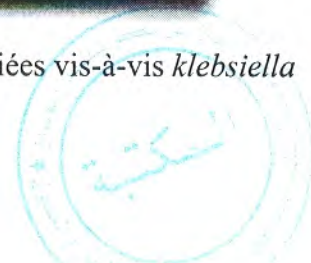
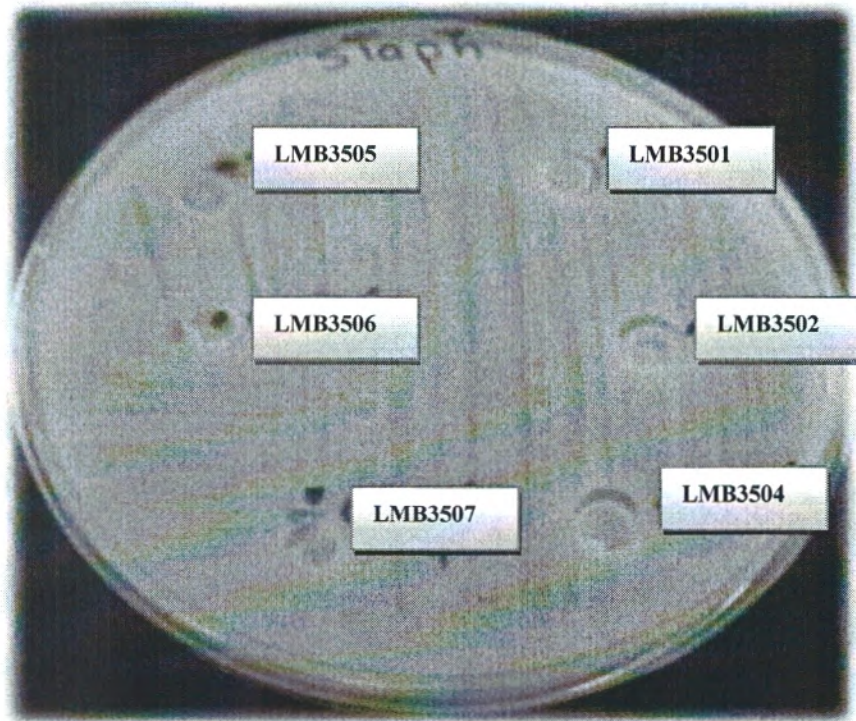


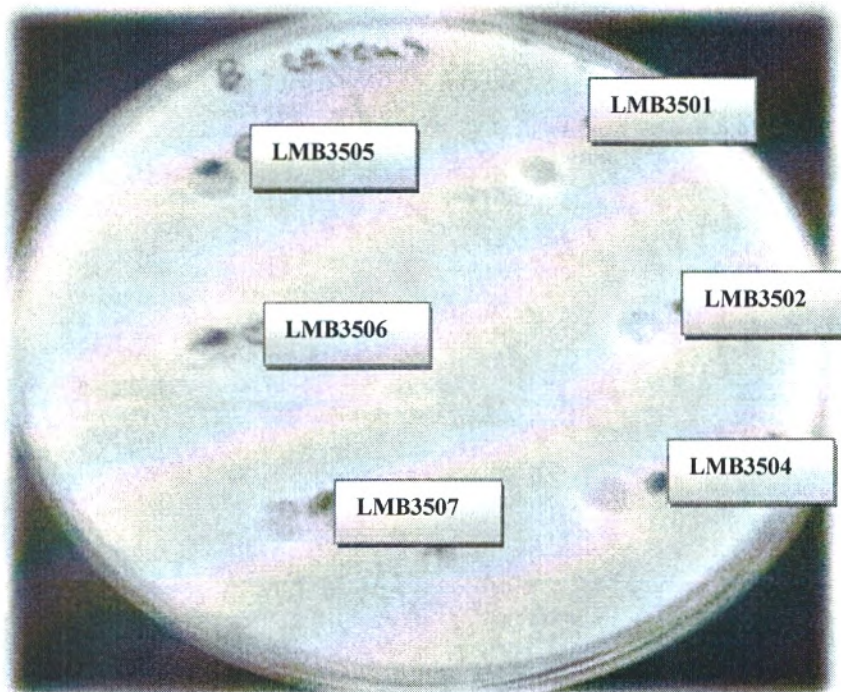
Figure 12 : Test d'activité antimicrobienne des souches étudiées vis-à-vis *klebsiella pneumoniae*







**Figure 13 :** Test d'activité antimicrobienne des souches étudiées vis-à-vis *Staphylococcus aureus*



**Figure 14 :** Test d'activité antimicrobienne des souches étudiées vis-à-vis *Bacillus cereus*



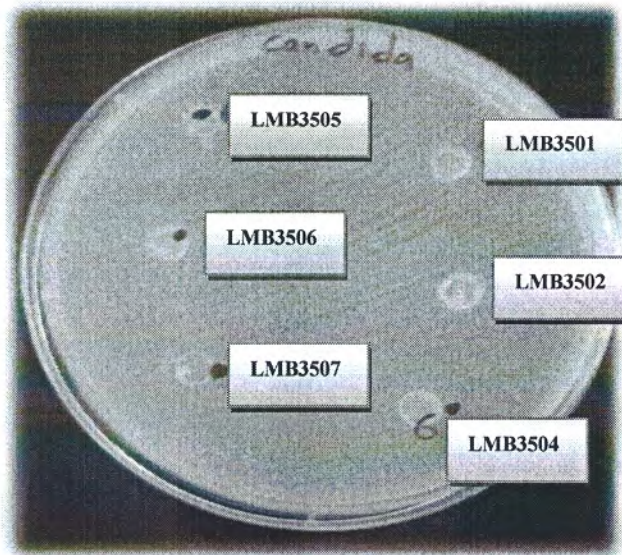


Figure 15 : Test d'activité antimicrobienne des souches étudiées vis-à-vis *candida albicans*

### 3.2. Technique des puits

Deux souches sont choisies sur la base des résultats obtenus par la technique des cylindres d'agar pour tester leur activité antimicrobienne par la technique des puits (LMB3504, LMB3506).

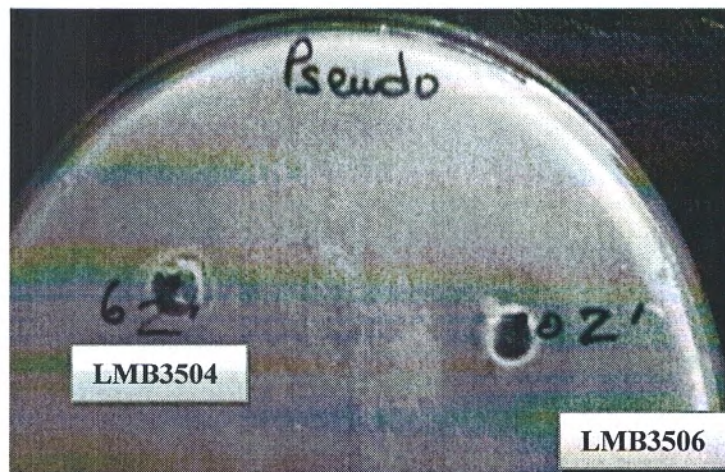
Les deux surnageant des cultures des deux isolats choisis obtenus par centrifugation a été testé pour son pouvoir antimicrobien contre les germes test par la technique des puits. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Résultats de l'activité antimicrobienne par la technique des puits

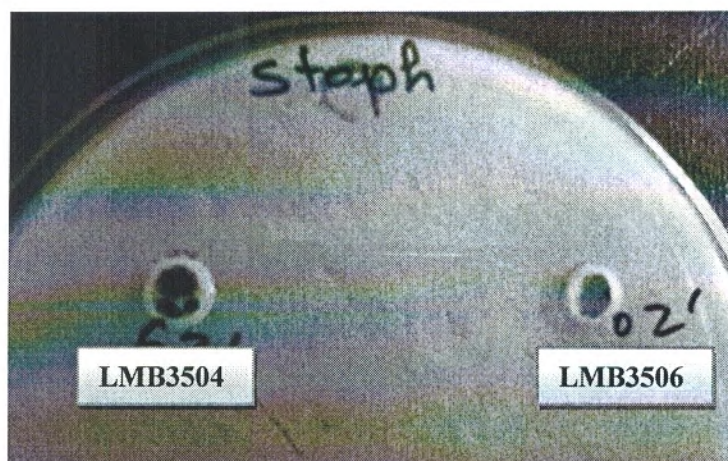
Germes tests	Diamètre de zone d'inhibition en (mm)	
	LMB3504	LMB3506
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	/
<i>Bacillus cereus</i>	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	/	/
<i>Candida albicans</i>	/	/



Le surnageant de la souche LMB3506 a montré une activité contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 seulement (zone d'inhibition de 17 mm) (figure 16). Le surnageant de LMB3504 a présenté une activité contre deux germes (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, zone d'inhibition de 9 mm) et (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, zone d'inhibition de 8 mm).



**Figure 16 :** Test d'activité antimicrobienne par la technique des puits de LMB3504 et LMB3506 vis-à-vis *pseudomonas aeruginosa*



**Figure 17 :** Test d'activité antimicrobienne par la technique des puits de LMB3504 et LMB3506 vis-à-vis *Staphylococcus aureus*



#### 4. Discussion

Cette étude réalisée sur des échantillons d'eau prélevés à partir de la source thermale de Hammam Dedagh (Guelma) avait pour objectif le screening de quelques *Bacillus* extrêmophiles et la mise en évidence des activités antimicrobiennes de ces microorganismes.

L'écosystème étudié dans ce travail a été choisi pour ses caractéristiques physiques et chimiques extrêmes. La source chaude de Hammam Debagh est la plus florissante de l'Algérie et ces eaux sont les plus chaudes (jusqu'à 98°C) (OUALI, 2008).

Cette étude a permis l'isolement de sept souches en forme bâtonnet à Gram positif, aérobies et formant des spores.

Ces caractéristiques phénotypiques distinguent la plus part des espèces thermophiles et hyperthermophiles isolées à partir des sources hydrothermales affiliées au genre *Bacillus* (Yuli *et al.*, 2004 ; Al-Quadani *et al.*, 2009 ; Fooladj *et al.*, 2010 ). Pour ces raisons et selon les critères de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (De Vos *et al.*, 2009), Nos isolats sont affiliés au genre *Bacillus* malgré que ce genre est un genre bactérien très complexe à identifier par les méthodes classiques basées sur les caractères phénotypiques (Nazina *et al.*, 2001).

La plupart des isolats sont mobiles, catalase positive et forment des endospores, c'est le cas de la plupart des isolats bactériens aérobies et aéro-anaérobies facultatif thermophile et hyperthermophile (Nazina *et al.*, 2001 ; Khalil, 2002).

Les milieux de culture ayant servis à leur isolement sont utilisés pour l'étude d'une large panoplie de microorganismes thermophiles aérobies appartenant à plusieurs groupes taxonomiques (*Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus*, etc.) (Fooladj *et al.*, 2010 ; Gomri, 2012).

L'ensemble des isolats montrent une bonne croissance à 65 °C (en milieu liquide) et à 55°C (en milieu solide). D'après ces résultats nous pouvons qualifier les souches étudiées comme thermophiles extrêmes en suivant la classification établie par (Baker *et al.*, 2001). Ces résultats restent hypothétiques du fait de la non réalisation de la cinétique de croissance en fonction de la température.

Les thermophiles ont, au cours de l'évolution, développé des stratégies adaptatives très variées. Ils présentent de ce fait un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans des conditions extrêmes, mais aussi de se développer souvent de manière optimale dans des niches écologiques extrêmes. Les propriétés singulières de certaines de ces biomolécules suscitent de ce fait l'intérêt des chercheurs (**Guezennec, 2002**).

Tous les isolats sont producteurs d'enzymes hydrolytiques extracellulaires à une température élevée (à 55°C), ils sont dotés par des activités amylolytiques, protéolytiques, et lipolytiques.

Les *Bacillus* thermophiles et hyperthermophiles constituent une immense source d'enzymes et plusieurs espèces appartenant à ce genre portent un bon bagage enzymatique avec des propriétés uniques (**Egorova et Antranikian, 2005**).

L'activité amylolytique est rencontrée chez de nombreuses *Bacillus. Sp* isolées à partir des sources thermales (**al Quadan et al., 2009 ; Fooladj et al., 2010**).

Les membres thermophiles des *Bacillaceae* ont été beaucoup étudiés pour leurs possibilités de production de protéases thermostables tels que *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* (**Ferrero et al., 1996; Booyanas et al., 2000 ; Kumar,2002**).

Les *Bacillus* thermophiles et hyperthermophiles représentent une bonne source d'enzymes avec des avantages absolus, pour cela, ils sont les plus employés en biotechnologie (**Lagzian et al., 2012**).

Les techniques utilisées pour le screening d'activités antimicrobiennes sont des méthodes de diffusion en milieu gélosé (technique des cylindres d'agar et la technique des puits). Ces deux techniques sont les plus utilisées pour le criblage des biomolécules antimicrobiennes.

Le test d'activité antimicrobienne des isolats par la technique des cylindres d'agar a montré que la majorité des isolats présentent une activité antimicrobienne vis-à-vis les germes test sauf *Candida albicans* (absence d'activité antifongique) (tableau 9).



La majorité des isolats agissent plus sur les bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC70603), avec une activité antibactérienne très importante vis à vis *Pseudomonas aeruginosa* (le diamètre de zone d'inhibition atteignant jusqu'à 20 mm).

Il est très intéressant de signaler ce pouvoir inhibiteur immense vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* car Le genre *Pseudomonas* et les espèces voisines comprennent des bactéries largement distribuées dans l'environnement, et dont certaines sont d'importants pathogènes pour l'homme. Ce sont des germes résistants à de nombreux antibiotiques. *P. aeruginosa* est responsable de toute une gamme d'infections, en particulier de plaies de l'arbre urinaire, ou septicémiques (Avril *et al.*, 1992).

Ces résultats confirment les résultats de plusieurs études qui affirment la capacité de microorganismes thermophiles isolées de sources chaudes terrestre pour leur production de substances antibactériennes actives contre des microorganismes pathogènes (Awais *et al.*, 2007; Syed *et al.*, 2009 ; Yakhlef *et al.*, 2012 ).

Nos isolats ont montré une bonne activité vis à vis les bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC70603) par contre, des études antérieures ont indiqué que les activités antimicrobiennes produites par les espèces du genre *Bacillus* sont plus efficaces contre les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif (Awais *et al.*, 2007 ; Yakhlef *et al.*, 2012).

Pourtant l'étude des microorganismes thermophiles ou hyperthermophiles indigènes à ces milieux hostiles à la vie peut aider à mieux exploiter cette importante source de molécules bioactives à des températures nettement plus élevées que celles d'organismes conventionnels, en particulier leurs molécules antimicrobiennes.

Une deuxième technique est utilisée pour la mise en évidence des activités antimicrobiennes, c'est la technique des puits. Deux isolats présentant les meilleures zones d'inhibition par la technique des cylindres d'agar ont été choisis pour le screening secondaire (technique des puits).

Le surnageant de cultures obtenues par centrifugation à été testé pour son pouvoir antibactérien contre les germes test.



Les résultats obtenus (tableau 10) montrent qu'une souche a présenté une activité vis à vis *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 seulement, par contre la deuxième souche a présenté une activité vis à vis deux germes (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC25923). La meilleure activité obtenue c'est vis à vis *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (bactéries à Gram négatif) avec une zone d'inhibition de 17 mm.

Nous observons que le diamètre des zones d'inhibitions révélées varie entre les deux techniques (technique des cylindres d'agar et la technique des puits), les bons résultats sont obtenus par la méthode des cylindres d'agar. Nous pouvons dire que le surnageant ne donne pas l'activité idéal, Il est possible que le composé inhibiteur synthétisé par les souches ne diffuse pas dans le milieu aqueux. Cette observation est conforme aux études réalisées par (Rosenfield et Zobell., 1947 ; Burkholder *et al.*, 1966) et plus tard par (Hosny *et al.*, 2011) où ils ont conclu que les composés inhibiteurs restent étroitement liés à la surface externe de la cellule.

Enfin, notre étude nous a permis de caractériser et identifier jusqu'au genre des microorganismes qui peuvent vivre dans une source thermale (milieu extrême) et montrer leur importance dans le domaine de biotechnologie par leur capacité de production des substances bioactives comme les enzymes et les antibiotiques.



**CONCLUSION  
GENERALE  
ET PERSPECTIVES**

---

## Conclusion générale et perspectives

Les extrémophiles sont des microorganismes qui possèdent des possibilités d'applications dans plusieurs domaines : l'agriculture, la médecine, les cosmétiques ou encore l'alimentation... . Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles sont parmi les extrémophiles les mieux étudiés, isolés de différents environnements, leurs molécules bioactives ont trouvé plusieurs applications à cause de leurs propriétés dépassant celles de leurs contreparties mésophiles.

Dans les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles, le genre *Bacillus* est considéré parmi les principaux éléments dans le domaine de la biotechnologie grâce à sa capacité de produire et sécréter des différentes molécules et en grande quantité telles que les enzymes extracellulaires, les antibiotiques, les polysaccharides et d'autres molécules de nature diverse.

Dans cette étude, un screening de quelques *Bacillus* extrémophiles a été effectué à partir d'échantillons d'eau de la source thermale de Hammam Debagh (Guelma) (la température est de 95°C).

Sept souches thermophiles ont été isolées de forme bâtonnet à Gram positif, forment des spores et possèdent la catalase. Elles sont biochimiquement différentes mais partagent quelques caractères.

Ces souches étudiées ont la capacité de produire des différents enzymes extracellulaires importants industriellement (amylase, protéase, lipase) à partir de plusieurs substrats (Amidon, Caséine, Tween 80, Lécithine).

La mise en évidence des activités antimicrobiennes a montré que toutes les souches ont un pouvoir inhibiteur contre la majorité des germes tests utilisés sauf *Candida albicans*, (absence d'activité antifongique), avec une activité antibactérienne qui agissent plus sur les bactéries à Gram négatif (*Pseudomona aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*).





Pour nos perspectives de recherches au futur :

- l'étude phylogénétique des souches.
- L'extraction et l'analyse quantitative et qualitative de molécules antibactérienne produites par les souches isolées (CCM, HPLC, IR, UV).
- La purification et l'analyse des enzymes produits par les isolats pour l'utilisation en biotechnologie.
- La recherche de nouvelles espèces à partir de la même source thermique.

Les résultats obtenus dans cette modeste étude ont un caractère novateur en effet aucune publication concernant le genre *Bacillus* isolé à partir de cette source thermique productrice d'activité antimicrobiennes n'est citée dans la littérature.

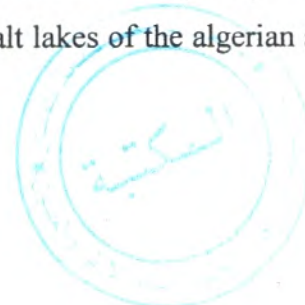
**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

---



Références bibliographiques

- Akel H., Al-Quadan F., and Yousef T. (2009). Characterization of a Purified Thermostable Protease from Hyperthermophilic *Bacillus* Strain HUTBS71. *European Journal of Scientific Research*, Vol.31 No.2, pp.280-288.
- Al-Quadan F., Akel H., and Natshi R. (2009). Characteristics of a novel highly thermostable and extremely thermophilic alkalitolerant amylase from hyperthermophilic *Bacillus* strain HUTBS71. *Journal of biological sciences* 9 (3) : 67-74.
- Antranikian G. (2009). Extremophiles and Biotechnology in: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Avril L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. (1992). Bactériologie Clinique, 2<sup>ème</sup> édition 522p.
- Awais M., Aamer A. S., Abdul H. and Fariha H. (2007). Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *bacillus* sp. *Pak. J. Bot.*, 39(4): 1303-1312.
- Baker G., gaffar s., Cowan D., Suharto A. (2001). Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *Federation of European Microbiological Societies* 103-109.
- Bartlett D., Kato C., and Horikoshi K. (1995). High-pressure influences on gene and protein expression, *Res. Microbiol.* 146 697–706. in : Minic Z., Serre V., Hervé G. (2006). Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *C. R. Biologies* 329 : 527–540.
- Biomérieux, (2006). *Applications Bio Pharmaceutiques*.  
Http : [www.biomerieux.fr/servlet/srt /srt/bio/france/dyn](http://www.biomerieux.fr/servlet/srt /srt/bio/france/dyn).
- Boonyanas S., Supachok S., Suree P., and Shuitein C. (2000). Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Exp. Purif.*, 20:142-151.
- Boughachiche F., Reghioua S., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A., Boulahrouf A. (2005). Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkhia d'Ain Mlila. *Sciences & Technologie C – N°23*, pp. 5-10.
- Boutaiba S., Hacene H., Bidle K., and Maupin-Furlow J. (2011). Microbial diversity of the hypersaline sidi ameur and himalatt Salt lakes of the algerian sahara. *J Arid Environ.* 75(10): 909–916.



- Burkholder P.R., Pfister R.M. and Leitz F.H. (1966) .Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. *Applied Microbiology*; 4: 649-653.
- Castro-Ochoa L., Rodriguez-Gomez C., Valerio-Alfaro G., and Ros R. (2005). Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology* 37 : 648–654.
- Cité de la mer. (Mars 2012). Bactéries des abysses. Dossier thématique.
- De Rosa M., Trincone A., Nicolaus B., and Gambacorta A. (1991). Archaeobacteria: lipids, in: G. di Prisco (Ed.), *Life Under Extreme Conditions*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 6– 87. in : Minic Z., Serre V., et Hervé G. (2006). Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *C. R. Biologies* 329 : 527–540.
- 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> édition., The *Firmicute*. Springer. New York. Volume Three. 63-67.
- Demirjian D., Morís-Varas F. and Cassidy C. (2001). Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5:144–151.
- Eccleston G. P., Brooks P. R., Kurtboke D. I. (2008). The occurrence of bioactive micromonosporae in aquatic habitats of the sunshine coast in Australia, *Marine Drugs*, 6, 243-261.
- Egorova K., and Antranikian G. (2005). Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.*, 8: 649–55.
- Euzéby J. (2002). dictionnaire de bacteriologie vétérinaire-en ligne disponible à <http://www.bacterio.cict.fr> . in : Dromigny E. (2009). *Bacillus anthracis*. Editions médicales internationales. Collection « Monographies de microbiologie » dirigée par Jean-Paul Larpent.
- Ferrero M., Castro G., Abate C., Baigori M. and Sineriz F. (1996). Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR29: isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45: 327-332.
- Filali F., Zaid A., Zekhnini Z., and Frere J. (1997). Recherche de bactéries thermophiles résistantes aux antibiotiques dans les bains traditionnels. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* Vol. 20, NO. 4, pp. 335-344.



- **Fooladi J., and Sajjadian A. (2010).** Screening the thermophilic and hyperthermophilic bacterial population of three Iranian hot-springs to detect the thermostable  $\alpha$ - amylase producing strain. *Iran. J. Microbiol.* 2 (1) : 49-53.
- **Girard H., Rougieux R. (1967).** Techniques De Microbiologie Agricole. 2<sup>ème</sup> édition DUNOD PARIS 215 p.
- **Gomri M. (2012).** Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermales terrestres de l'Est algérien. Université Mentouri-Constantine-, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (INATAA), Département de Biotechnologie alimentaire.
- **Gonzalez C., Gutierrez C., Ramirez C. (1978).** *Halobacterium vallismortis* sp. nov. An amyolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol* 24: 710–715.
- **Guezennec J. (2002).** Deep-sea hydrothermal vents: a new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29 : 204–208.
- **Gugliandolo C., Maugeri T., Caccamo D., and Stackebrandt E. (2003).** *Bacillus aeolius* sp. nov. a Novel Thermophilic, Halophilic Marine *Bacillus* Species from Eolian Islands (Italy). *System. Appl. Microbiol.* 26, 172–176.
- **Harley J. P. et Prescott L. M. (2002).** Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edn. 449 p.
- **Hosny A.D., Hosni Sheir D. and Eldewany A., 2011.** Production of Antimicrobial Agent from Marine Bacteria Isolated from Mediterranean. *Australian Journal Basic and Applied Sciences*; 5: 121-128.
- **Huber H., and Stetter K. (1998).** Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology. *Journal of Biotechnology* 64 : 39–52.
- **Khalil B. (2002).** Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* species from thermal ponds in Jordan. *Pakistan journal of biological sciences* 5(11) : 1272-1273.
- **Khelil Klouche N. 1998.** Etude des antibiotiques biosynthétisés par des bactéries filamenteuses extrêmophiles, notamment *Metallogenium* sp. Thèse de Magister en Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université Aboubakr Belkaid- Tlemcen, Institut des sciences de la Nature. Algérie. 157p.

- **Khulana S. and Niranjana B. (2012).** Antimicrobial activity of thermotolerant bacterial isolate from coal mine spoil. *African Journal of Microbiology Research* Vol.6 (26), pp. 5459-5463.
- **Kumar C. (2002).** Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 34: 13-17.
- **Kumar S., Tsai C., and Nussinov R. (2000).** Factors enhancing protein thermostability, *Protein Eng.* 13 179–191. in : **Minic Z., Serre V., et Hervé G. (2006).** Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *C. R. Biologies* 329 : 527–540.
- **Lagzian M., and Asoodeha A. (2012).** An extremely thermotolerant, alkaliphilic subtilisin-like protease from hyperthermophilic *Bacillus* sp. MLA64. *International Journal of Biological Macromolecules* 51 : 960– 967.
- **Larkin J., Strohl W., Beggiatoa, Thiolithrix, and Thioploca. (1983),** *Annu. Rev. Microbiol.* 37 : 341–367. in : **Minic Z., Serre V., et Hervé G. (2006).** Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *C. R. Biologies* 329 : 527–540.
- **Larpent J. (2000).** Introduction à la nouvelle classification bactériennes- les principaux groupes bactériennes. Editions Tec et Doc paris.28 page in : **Dromigny E., (2009).** *Bacillus anthracis*. Editions médicales internationales. Collection « Monographies de microbiologie » dirigée par Jean-Paul Larpent.
- **Laubier L. (1991).** Ecosystèmes benthiques profonds et chimiosynthèse bactérienne : Sources hydrothermales et suintements froids. *IFREMER. Actes de colloques* n° 12-1991.
- **Logan N. A., Berge O., Bishop A. H., Busse H. J., De Vos P., Fritze D., Heyndrickx M., Kämpfer P., Rabinovitch I., Salkinoja-Salonen M. S., Seldin I. and Ventosa A. (2009).** Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 2114-2121.
- **Mawadza C., Hatti-Kaul R., Zvauya R., and Mattiasson B. (2000).** Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology* 83 : 177–187.
- **Minic Z., Serre V., and Hervé G. (2006).** Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *C. R. Biologies* 329 : 527–540.



- **Moulla A., Guendouz A. (2003).** Etude des ressources en eau souterraines en zones arides (Sahara algérien) par les méthodes isotopiques. *Hydrology of the Mediterranean and Semiarid Regions*. IAHS Publ. no. 278.
- **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 uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int., J., Syst., Evol., Microbiol.*, 51:433-446.
- **Ouali S. (2008).** Les sources Thermales en Algérie. Recherche et Développement.
- **Rosenfield W.D. and Zobell C.E. (1947).** Antibiotic production by marine microorganisms. *Journal of Bacteriology*; 54: 393-398.
- **Roxana C., Simona M., Gabriela P., Lucia D., Kamekura M., Mădălin E. (2009).** Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salterystal, 5: 4458-4466.
- **Schallmeyer M., Singh A., and Ward O. (2004).** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50: 1–17.
- **Schwartsmann G., da Rocha A., Berlinck R., and Jimeno J. (2001).** Marine organisms as a source of new anticancer agents, *Lancet Oncol.* 2 : 221–225. in : **Minic Z., Serre V., et Hervé G. (2006).** Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *C. R. Biologies* 329 : 527–540.
- **Syed A. M., Safia A. and Abdul H. (2009).** Antibiotic production by thermophilic *Bacillus* specie SAT-4. *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol. 22, No.3, pp. 339-345.
- **TSCA. (1997).** Final risk assessment of *Bacillus licheniformis*. Biotechnology program under toxic substances control Act (TSCA). in : **Dromigny E. (2009).** *Bacillus anthracis*. Editions médicales internationales. Collection « Monographies de microbiologie » dirigée par Jean-Paul Larpent.
- **Van den Burg B. (2003).** Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6:213–218.

- **Vinogradov A. (2003).** DNA helix: the importance of being GC-rich, *Nucleic Acids Res.* 31 1838–1844. in : **Minic Z., Serre V., et Hervé G. (2006).** Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *C. R. Biologies* 329 : 527–540.
- **Woese R., Kandler o., Mark L. (1990).** Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains of Archea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4576-4579.
- **Yakhlef W., and Darbouche A. (2012).** Metabolic Diversity of Thermophilic Bacteria from Hot Springs in Algeria. *Journal Academica* Vol. 2(1), pp. 57-65.
- **Yuli P., Suhartono M., Rukayadi Y., Hwang J., and Pyun Y. (2004).** Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the indonesian *Bacillus* sp.13.26.
- **Zerizer H., Oulmi L., Boughachiche F., Reghioua S., Boudemagh A., Kitouni M., Boulahrouf A. (2006).** Identification d'une actinomycétale, productrice d'antibactériens, Isolée de sols arides de la région de Biskra. *Sciences & Technologie C – N°24*, pp.17-22.



# ANNEXES

---

## Annexes

## Milieux de cultures

## Bouillon nutritif

Peptone .....	10,0g
Extrait de levure .....	5,0 g
Chlorure de sodium .....	5,0 g
Eau distillée .....	1000ml

pH = 7,2

## Gélose nutritive

Peptone .....	15
Extrait de viande .....	10g
Extrait de levure .....	02g
Chlorure de sodium .....	05g
Agar .....	20g
Eau distillée .....	1000ml

pH =6,8-7,4

## Gélose à Amidon

Gélose nutritive .....	100ml
Amidon .....	01g





### Milieu pour la recherche de la lécithinase (*Egg-yolk agar*)

Gélose nutritive .....	90 ml
Emulsion de jaune d'oeuf .....	10ml

#### Préparation de l'émulsion de jaune d'œuf

Après avoir flamber la coquille avec de l'alcool pendant 30 secondes, récupérer le jaune d'œuf et additionner 4 fois le volume en eau distillée stérile, mélanger rigoureusement puis mettre le mélange à l'étuve pendant 2 heures à 30°C et ensuite au réfrigérateur pendant 24 heures.

**N. B.** Au moment de l'utilisation, mettre la gélose nutritive en surfusion (45°C) et ajouter l'émulsion de jaune d'œuf, après séchage le milieu est ensemencé.

#### Gélose au lait

##### Préparation 1

Lait écrémé poudre .....	05g
Eau distillée .....	50ml

Stérilisation par autoclave à 121°C / 20min

##### Préparation 2

Agar .....	01g
Eau distillée .....	50ml

Stérilisation par autoclave à 121°C / 20min



**N. B.** La stérilisation des deux préparations se fait séparément, ensuite et au moment de l'utilisation les deux préparations sont mises en surfusion (45°C) et mélangées puis coulées sur boîte pétri. Après séchage, le milieu est ensemencé.

### Milieu pour la mise en évidence de l'hydrolyse de tween 80

Extrait de levure .....	5 g
NaNO <sub>3</sub> .....	1 g
Solution saline.....	50 ml
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O.....	0,1g
Tween 80 .....	10 ml
Agar .....	8 g
Eau distillée .....	1000ml

pH = 7,2

### Solutions

#### Eau physiologique

Eau distillée .....	1000ml
Chlorure de sodium (NaCl) .....	9g



## Résumé

Cette étude ayant pour objectif, le criblage des *Bacillus* extrémophiles à partir de la source thermale de Hammam Debagh (Guelma) et la mise en évidence d'activités antimicrobiennes de ces souches isolées. Pour cela Sept souches ont été isolées de forme bâtonnets à gram positif aérobies et formant des spores et ont la capacité de production des enzymes extracellulaires (amylase, protéase, lipase).

L'activité antimicrobienne à été effectués vis-à-vis cinq germes test (quatre bactéries et une levure) par deux techniques (technique des cylindres d'agar et la technique des puits).

Tous les isolats ont montré un pouvoir inhibiteur contre la majorité des germes tests sauf *Candida albicans*, avec une activité antibactérienne qui agisse plus contre les bactéries à gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*).

**Mots clés :** screening, *Bacillus*, extrémophile, activité antibactérienne

## Abstract

This study having for objective, the screening of *Bacillus* extremophiles from the hot springs of Hammam Debagh (Guelma) and the detection of antimicrobial activity of these isolates. For this, seven strains were isolated, rod shapes aerobic, gram positive and form spores and have the production capacity of extracellular enzymes (amylase, protease, lipase).

The antimicrobial activity was carried out against five bacteria test (four bacteria and yeast) by two techniques (agar cylinder technique and technique of wells).

All isolates showed inhibitory effects against most germs tests except *Candida albicans*, with antibacterial activity which acts against most gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*).

**Key words:** screening, *Bacillus*, extremophile, antibacterial activity

## المخلص

إن الهدف من هذه الدراسة هو التنقيب عن بكتيريا موجودة في مياه منبع حمام دباغ -ولاية قالمة- وهي *Bacillus* وتبين قدرتها على إنتاج المضادات الحيوية. لهذا الغرض قمنا بعزل 7 سلالات هوائية موجبة الغرام على شكل عصيات مشكلة للأبواغ ومنتجة لأنزيمات ( أميلاز، بروتياز وليباز).

المضادات الحيوية جربت ضد خمسة ميكروبات (أربع سلالات بكتيرية وخميرة واحدة) بطريقتين مختلفتين (تقنية نواتر الأفار وتقنية الأبار).

جل الإيزولات أظهروا الفعالية المثبطة ضد غالبية الميكروبات المستعملة ما عدا *Candida albicans* مع فعالية أكبر ضد (*Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae*).

## الكلمات المفتاحية

البحث، *Bacillus*، الظروف الصعبة، النشاط المضاد للميكروبات

