République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de L'Univers
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie et Contrôle de Qualité

Présenté par :

BRAHIMI Marwa Rehab

Thème :

Caractérisation microbiologique des sources thermales situées dans l'Ouest algérien

Soutenu le 24/06/2026, devant le Jury composé de :

Président	**BELYAGOUBI Larbi**	**Professeur**	**Université Tlemcen**
Encadrant	**ZERHOUNI Khadidja**	**MCB**	**Université Tlemcen**
Examinatrice	**BOUMEDIENE Karima**	**MCB**	**Université Tlemcen**

Année universitaire :2025/2026

Remerciements

Je remercie tout d'abord Allah le Tout-Puissant, qui m'a accordé le courage, la volonté, la santé et la patience nécessaires pour mener à bien ce modeste travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes plus vifs remerciements à mon encadrante, **Madame ZERHOUNI Khadidja**, Maître de conférences Classe B au département de Biologie à l'Université de Tlemcen, Je la remercie du fond du cœur pour sa rigueur scientifique, sa disponibilité constante, mais aussi pour sa grande générosité humaine, sa patience exemplaire et sa bienveillance qui m'ont guidée à chaque étape de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury qui ont honoré ce travail en acceptant de l'évaluer, notamment **Monsieur Belyagoubi Larbi** Professeur au département de Biologie à l'Université de Tlemcen, qui a accepté de présider le jury, ainsi que **Madame Boumediene Karima** Maître de conférences classe B au département de Biologie à l'Université de Tlemcen, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Enfin, je tiens à remercier toute l'équipe pédagogique de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen, ainsi que tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, par leur soutien moral ou technique, à la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

À ces moments qui m'ont façonnée en silence,

À chaque fatigue qui a été le début d'un espoir,

Et à chaque rêve qui a su résister à l'extinction en moi…

Je dédie le fruit de mes efforts,

À ma chère famille,

Merci d'avoir toujours été à mes côtés.

À la mémoire de ma chère mère,

Que son âme repose en paix.

Tu as toujours été ma plus grande motivation. Chaque mot de ce travail est l'écho de tes prières, et chaque pas vers le succès est un hommage à ton âme pure, qui demeure la lumière guidant mes pas dans l'obscurité.

À moi-même,

Qui ai su persévérer, résister et ne pas abandonner malgré les difficultés.

Merci à cette âme qui ne s'est pas laissé briser par les tempêtes de la vie,

Et à ce cœur qui a gardé foi en la réussite malgré la dureté du chemin.

Je suis fière de ma résilience dans les moments les plus sombres,

Pour chaque nuit blanche, et pour chaque effort fourni.

Ce travail n'est pas de simples pages à lire,

Mais l'histoire d'un combat, d'une ambition, d'une volonté sincère,

Et d'une conviction profonde que chaque effort porte en lui sa récompense.

Je l'ai fait, Maman… Ce fruit est le résultat de ton amour qui n'a jamais quitté mon cœur.

Table des matières

Remerciement……I
Dédicace ……...II
Table des matières ……III
Liste des abréviations ……...…IV
Liste des figures……...…...V
Liste des tableaux ……..……VI
ملخص……...……VII
Abstract……VIII
Résumé ……...IX

I. Introduction générale ……..……1
II. Matériel et méthode 7

II .1 Site d'étude 8

II .2 Matériel …… 9

II .2.1 Matériel Biologique 9

II .2.2 Matériel Non Biologique 9

II.3 Méthodes 10

II.3.1 Procédure de prélèvement et de transport des échantillons 10

II.3.2 Isolement ; purification et conservation des isolats 12

II.3.2.1 Isolement des souches bactériennes 12

II.3.2.2 Purification 13

II.3.2.3 Conservation des cultures pures 13

II.3.3 Identification 13

II.3.3.1 Étude Macroscopique 13

II.3.3.2 Observation microscopique 14

II.3.3.2.1 Principe de la coloration de Gram 14

II.3.3.2.2 Protocole expérimental de la coloration de Gram..... 14

II.3.4 Étude des paramètres de croissances 15

II.3.4.1 Influence de la température (T°) 15

II.3.4.2 Influence de la salinité (NaCl) 15

II.3.4.3 Influence du potentiel Hydrogène (pH) 16

II.3.5 Recherches des enzymes respiratoires 16

II.3.5.1 La catalase 16

II.3.5.2 Test oxydase (Technique sur bandelette) 17
II.3.5.3 Test ONPG 17
II.3.6 Etude des caractères biochimiques…….. ……18
II.3.6.1 Test à l'indole 18
II.3.6.2 Test de Mannitol-Mobilité 19
II.3.6.3 Citrate de Simmons 19
II.3.6.4 Test sur milieu Triple Sugar Iron (TSI) 20
II.3.7 Mise en évidence des activités enzymatiques extracellulaires 21
II.3.7.1 Recherche de l'activité amylolytique 21
II.3.7.2 Activités protéolytiques (Protéases) 22
II.3.7.2.1 Hydrolyse de la Caséine 22
II.3.7.2.2 Hydrolyse de la Gélatine (Gélatinase) par la Méthode de Frazier 22
II.3.7.3 Activités lipolytiques (Lipases – Tween 80) 23
II.3.8 Évaluation de l'activité antimicrobienne 23
II.3.8.1 Préparation et standardisation de l'inoculum tests 24
II.3.8.2 Méthode des disques d'agar (Agar-discs method) 25
III. Résultat et discussion ……...……...26
III.1 Isolement 27
III.2 La purification 28
III.3 Identification 29
III.3.1 Etude macroscopique 29
III.3.2 Etude microscopique 29
III.4 Étude des paramètres de croissance 31
III.4.1 Influence de la température (T°) 31
III.4.2 Influence de la salinité (NaCl) 33
III.4.3 Influence du potentiel Hydrogène (pH) 34
III.5 Recherches des enzymes respiratoires 35
III.5.1 Catalase 35
III.5.2 Oxydase 35
III.5.3 Test ONPG 36
III.6 Etude des caractères biochimiques 37
III.6.1 Test à l'indole 37

III.6.2 Test de Mannitol-Mobilité 37
III.6.3 Test citrate de Simmons 39
III.6.4 Test de TSI 40
III.7 Mise en évidence des activités enzymatiques extracellulaires 41
III.7.1 Recherche de l'activité amylolytique 41
III.7.2 Activités protéolytiques (Protéases) 43
III.7.2.1 Hydrolyse de la Caséine 43
III.7.2.2 Hydrolyse de la Gélatine 44
III.7.3 Activités lipolytiques (Lipases – Tween 80) 46
III.8 Évaluation de l'activité antimicrobienne 48
IV Conclusion……...…….53
V Référence bibliographique……….……...56

Liste des abréviations

(+) : Résultat positif

(-) : Résultat négatif

B : Hammam Boughrara (Lieu de prélèvement)

C : Hammam Chiguer (Lieu de prélèvement)

CO_2 : Dioxyde de carbone

DO : Densité optique

G+ : Gram positif

G- : Gram négatif

GN : Gélose Nutritive

H_2O : Eau

H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène (Eau oxygénée)

H_2S : Sulfure d'hydrogène (Hydrogène sulfuré)

HCl : Acide chlorhydrique

McFarland : Échelle d'opacité bactérienne (Étalon de turbidité)

MH : Mueller-Hinton (Milieu de culture)

mL : Millilitre

mm : Millimètre

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium (Soude)

nm : Nanomètre

O_2 : Oxygène

ONPG : Ortho-Nitrophényl-\beta-D-Galactopyranoside

PCA : Plate Count Agar (Milieu de culture)

pH : Potentiel Hydrogène

T° : Température

TSI : Triple Sugar Iron (Milieu de culture)

UFC : Unité Formant Colonie

(v/v) : Volume par volume (Concentration volumique)

(w/v) : Weight par volume (Poids par volume - Concentration massique)

µL : Microlitre

°C : Degré Celsius

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des classes thermales des eaux ……...…2

Figure 2 : schéma conceptuel des six grands groupes chimiques des eaux thermales……..3

Figure 3 : représentation pyramidale de la classification des eaux thermales selon leur charge minérale……..……4

Figure 4 : Localisation géographique de Hammam Boughrara ……. …….……8

Figure 5 : Localisation géographique de Hammam Chiguer ……...……9

Figure 6 : Stations d'échantillonnage et opération de prélèvement des eaux thermales….10

Figure 7 : Remplissage des flacons d'échantillonnage au niveau des sources thermales d'étude ……...……...…11

Figure 8 : Conservation des échantillons en enceinte isotherme (+4°c) durant le transfert vers le laboratoire ……..……..11

Figure 9 : Ensemencement de l'eau sur milieux GN et PCA ……..…12

Figure 10 : Mise en contact des disques d'ONPG avec les suspensions bactériennes pour le test de la β-galactosidase ……...……...……18

Figure 11 : Culture des isolats dans l'eaux peptonée pour la recherche de la production d'indole ……...……...……..…18

Figure 12 : Ensemencements des isolats (B1, B2, C1, C2) dans le milieu semi-solide Mannitol -Mobilité ……...……...…19

Figure 13 : Ensemencement des isolats bactériens sur milieu citrate de Simmons incliné ……..……20

Figure 14 : Inoculation des isolats bactériens sur le milieu différentiel Triple Sugar Iron (TSI) par piqûre profonde et stries sur pente ……..……..…...……21

Figure 15 : Résultat de l'isolement primaire des échantillons d'eau de Boughrara (B) et Chiguer (C) sur milieux de culture Solides…….……...…...……27

Figure 16 : Souches purifiées (B1, B2, C1 et C2) obtenues par méthode des stries sur milieu solide …….…...…28

Figure 17 : Morphologie microscopique des isolats après coloration de gram (G×100) ...31

Figure 18 : Effet de différentes températures (30°C,37°C,45°C,55°C) sur développement des souches bactériennes ……..……...……32

Figure 19 : Effet du stress salin (NACL) sur la croissance des quatre isolats (B1, B2, C1, C2) ……...……...……33

Figure 20 : Profil de croissance des souches bactériennes (B1, B2, C1, C2) à différentes valeurs de pH …….…….....……34

Figure 21 : résultat du test de catalase sur lame pour les quatre souches ……..……35

Figure 22 : Résultat du test oxydase pour les quatre souches ……..……36

Figure 23 : Résultat Négatif du test à l'indole pour les isolats étudiés ……..37

Figure 24 : Résultats du test Mannitol-Mobilité. Noter le virage à l'orange pour C1(Mannitol+) et la diffusion de la croissance pour C2(Mobilité+) ……...38

Figure 25 : Résultats négatifs de l'utilisation du citrate sur milieu de Simmons après 48h d'incubation a 45°C …….…...…….……39

Figure 26 : Résultats de la croissance et des différentes réactions biochimiques sur milieu TSI, illustrant l'absence de fermentation des sucres et de production de gaz...……...40

Liste des tableaux

Tableau 1 : Souches de référence et milieux de culture utilisés dans le test d'activité antimicrobienne ……. 24

Tableau 2 : Caractéristiques macroscopiques des souches B1, B2, C1 et C2……...…… 29

Tableau 3 : Caractéristiques microscopique des isolats thermophiles …….....…30

Tableau 4 : Profil de croissance des isolats (B1, B2, C1, C2) soumis à différentes températures d'incubation……32

Tableau 5 : Comportement des isolats (B1, B2, C1, C2) vis-à-vis du stress salin après incubation…….……33

Tableau 6 : Effet des variations du PH sur l'aptitude de croissance des quatre isolats (B1, B2, C1, C2) ……..…34

Tableau 7 : Profil enzymatique (catalase, oxydase et ONPG) des isolats bactériens étudiés ……..……36

Tableau 8 : Résultats du test de l'indole pour les isolats B1, B2, C1, C2……..……37

Tableau 9 : Résultats du test Mannitol-Mobilité pour les isolats B1, B2, C1, C2……..…38

Tableau 10 : Aptitude des isolats thermophiles à l'utilisation du citrate……..……...…39

Tableau 11 : Evaluation du profil fermentaire et respiratoire des quatre souches (B1, B2, C1, C2) sur milieu TSI……...……. 40

Tableau 12 : Evaluation de l'activité amylolytique et mise en évidence de l'hydrolyse de l'amidon par les isolats bactériens……...……42

Tableau 13 : Evaluation de l'activité caséinique des quatre isolats bactériens étudiés…..44

Tableau 14 : Mise en évidence de l'activité gélatinasique des isolats étudiés……45

Tableau 15 : Evaluation de l'activité lipolytique des isolats B1, B2, C1etC2 sur milieu tween 80…….……. 47

Tableau 16 : Evaluation de l'activité des bactéries à gram positif des quatre isolats bactériens (B1, B2, C1, C2) et mesure des zones d'inhibition ……..……..……48

Tableau 17 : Evaluation de l'activité des bactéries à gram négatif des quatre isolats bactériens (B1, B2, C1, C2) et mesure des zones d'inhibition……49
Tableau 18 : Evaluation de l'activité antifongique des quatre isolats bactériens (B1, B2, C1, C2) et mesure des zones d'inhibition…….....50

ملخص

تُعدّ الينابيع الحموية أنظمة بيئية مميزة تؤوي تنوعًا واسعًا من الكائنات الحية الدقيقة المتكيفة مع درجات الحرارة المرتفعة. ومن بين هذه الكائنات، تحظى البكتيريا المحبة للحرارة باهتمام متزايد نظرًا لقدرتها على إنتاج إنزيمات ثابتة حراريًا تُستغل على نطاق واسع في العديد من المجالات الصناعية. هدفت هذه الدراسة إلى إجراء توصيف ميكروبيولوجي لمياه الينابيع الحموية لكل من حمام بوغرارة وحمام الشيغر (غرب الجزائر)، وذلك بهدف عزل بكتيريا متحملة للحرارة ذات إمكانات بيوتكنولوجية.

أسفرت الدراسة عن عزل أربع سلالات من العصيات موجبة الغرام(B1) ، B2، C1وC2)، أظهرت قدرات مختلفة على التكيف مع درجة الحرارة ودرجة الحموضة والملوحة. وعلى المستوى البيوكيميائي، تم الكشف عن نشاط إنزيم الكاتالاز لدى السلالتين B2 وC2، ونشاط إنزيم الأوكسيداز لدى السلالات B1 و B2وC1، في حين كانت اختبارات ONPG والإندول والسيترات و TSIسلبية لدى جميع السلالات المعزولة. كما أظهرت السلالات B1 و B2 و C2نشاطًا محللًا للنشا، بينما أظهرت السلالات B2 و C1و C2نشاطًا محللًا للكازيين، في حين لم يُسجل أي نشاط للجيلاتيناز أو الليباز.وأظهر تقييم النشاط المضاد للميكروبات تأثيرات تثبيطية متفاوتة ضد عدد من الكائنات الممرضة، شملت Enterococcus faecalis و Micrococcus luteusو Klebsiella pneumoniaeو Pseudomonas aeruginosaو .Candida albicansوقد تميزت السلالة B2 بأقوى نشاط تثبيطي ضد .M. luteus بقطر منطقة تثبيط بلغ 20 مم.تؤكد هذه النتائج التنوع الميكروبي للمواقع المدروسة، كما تبرز الإمكانات البيوتكنولوجية الواعدة للسلالات المعزولة في إنتاج الإنزيمات خارج الخلوية والمركبات الحيوية ذات النشاط المضاد للميكروبات.

الكلمات المفتاحية: الينابيع الحموية، حمام بوغرارة، حمام الشيغر، البكتيريا المتحملة للحرارة، التوصيف الميكروبيولوجي، الأنشطة الإنزيمية، النشاط المضاد للميكروبات.

.

Abstract

Thermal springs constitute unique ecosystems harboring a wide diversity of microorganisms adapted to high temperatures. Among them, thermophilic bacteria have attracted increasing interest due to their ability to produce thermostable enzymes widely used in various industrial sectors. The objective of this study was to perform a microbiological characterization of the thermal waters of Hammam Boughrara and Hammam Chiguer springs (Western Algeria) in order to isolate thermotolerant bacteria with biotechnological potential.

The study led to the isolation of four Gram-positive bacilli strains (B1, B2, C1, and C2) exhibiting diverse adaptation capacities to temperature, pH, and salinity. Biochemical characterization revealed catalase activity in strains B2 and C2, and oxidase activity in strains B1, B2, and C1, whereas ONPG, indole, citrate, and TSI tests were negative for all isolates. Furthermore, amylolytic activity was observed in strains B1, B2, and C2, while caseinolytic activity was detected in B2, C1, and C2. No gelatinase or lipolytic activity was recorded.The evaluation of antimicrobial activity revealed variable inhibitory effects against several pathogenic microorganisms, including Enterococcus faecalis, Micrococcus luteus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, and Candida albicans. Among the isolates, strain B2 exhibited the strongest activity against M. luteus, with an inhibition zone of 20 mm.Overall, these findings highlight the microbial diversity of the investigated thermal springs and demonstrate the biotechnological potential of the isolated strains for the production of extracellular enzymes and antimicrobial bioactive compounds.

Keywords: Thermal springs, Hammam Boughrara, Hammam Chiguer, thermotolerant bacteria, microbiological characterization, enzymatic activities, antimicrobial activity.

Résumé

Les sources thermales constituent des écosystèmes particuliers abritant une diversité de microorganismes adaptés aux températures élevées. Parmi eux, les bactéries thermophiles suscitent un intérêt croissant en raison de leur capacité à produire des enzymes thermostables largement exploitées dans divers domaines industriels. L'objectif de cette étude porte sur la caractérisation microbiologique des eaux des sources thermales de Hammam Boughrara et Hammam Chiguer (Ouest algérien) afin d'isoler des bactéries thermotolérantes à potentiel biotechnologique.

Les travaux ont permis d'isoler quatre souches de bacilles à Gram positif (B1, B2, C1 et C2) présentant une diversité d'adaptation selon la température, le pH et la salinité. Sur le plan biochimique, l'activité catalase est détectée chez B2 et C2, et l'oxydase chez B1, B2 et C1, alors que les tests ONPG, indole, citrate et TSI sont restés négatifs. De plus, une activité amylolytique (B1, B2, C2) et caséinolytique (B2, C1, C2) a été observée, sans aucune activité gélatinase ni lipolytique. L'évaluation de l'activité antimicrobienne a révélé des effets inhibiteurs variables contre plusieurs pathogènes (*Enterococcus faecalis, Micrococcus luteus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*), où la souche B2 s'est distinguée par une action marquée contre *M. luteus* (zone de 20 mm). Dans l'ensemble, ces résultats soulignent la diversité microbiologique des sites et mettent en évidence l'intérêt biotechnologique des isolats pour la production d'enzymes extracellulaires et de composés bioactifs antimicrobiens.

Mots-clés : Sources thermales, Hammam Boughrara, Hammam Chiguer, bactéries thermotolérantes, caractérisation microbiologique, activités enzymatiques, activité antimicrobienne.

Introduction Générale

Introduction Générale

L'eau constitue l'élément fondamental à l'origine de la vie et le pilier central de l'équilibre des écosystèmes planétaires. Au-delà de son rôle biologique universel, cette ressource vitale interagit continuellement avec les formations géologiques souterraines, acquérant ainsi des propriétés physico-chimiques uniques. Parmi ces ressources hydriques singulières, les eaux thermales se distinguent comme des entités hydrogéologiques d'une importance capitale. Selon les critères scientifiques établis, une eau est qualifiée de thermale lorsque sa température d'émergence à la source est significativement supérieure à la température moyenne annuelle de la région où elle jaillit **(Benzerfa *et al*., 2021).**

Ces fluides profonds possèdent une stabilité remarquable de leurs caractéristiques physico-chimiques au fil du temps. En effet, des paramètres clés tels que le débit, la température globale, ainsi que la charge globale en minéraux et en gaz dissous restent constantes pour chaque source, s'avérant largement indépendants des fluctuations climatiques et environnementales de surface, qu'il s'agisse des cycles saisonniers, de la pluviométrie locale ou des périodes de sécheresse **(Chorfi *et al*., 2019).**

D'un point de vue hydrochimique et réglementaire, l'eau thermale est fondamentalement définie comme une eau minérale naturelle (EMN) qui émerge spontanément de la terre à une température seuil d'au moins 25 degrés Celsius, ce qui correspond à 77 degrés Fahrenheit. Ce phénotype thermique s'explique par un long processus de circulation souterraine s'étalant sur plusieurs années, voire des décennies, au cours desquelles l'eau traverse des structures rocheuses profondes sous haute pression. Ce contact prolongé favorise une dissolution intense de la matrice rocheuse, enrichissant l'eau en macro-éléments minéraux et en oligo-éléments essentiels. Ce sont précisément ces combinaisons chimiques uniques qui lui confèrent ses propriétés curatives et thérapeutiques reconnues, d'autant plus que cette eau est extraite et exploitée à l'état pur, sans subir aucun traitement chimique ou artificiel préalable **(Nguyen Ba, 2020).**

Cette double spécificité, liée à la fois à la nature spéciale de leurs principes actifs, à la stabilité thermique de leurs sources et à la complexité de leurs compositions chimiques, confère à ces eaux des vertus biomédicales et thérapeutiques majeures **(JORA, 2007).** D'ailleurs, comme le souligne le dictionnaire **lexicographique Le Petit Robert (1994)**, une eau thermale associe intrinsèquement deux notions indissociables : une température élevée directement à la source et des propriétés intrinsèquement thérapeutiques.

La caractérisation et la différenciation des eaux thermales reposent sur une approche multidisciplinaire, car la complexité de leurs origines hydrogéologiques et la diversité des formations géologiques traversées empêchent de les définir par un seul paramètre. Ainsi, la communauté scientifique s'accorde à classer ces ressources thermo-minérales selon trois critères majeurs et complémentaires qui sont la température d'émergence, la composition chimique fine et le degré de minéralisation globale.

En premier lieu, le critère thermique s'avère être le premier indicateur de la nature profonde et de la circulation souterraine d'une eau. Selon la classification de référence établie par **Issaâdi (1992)**, les eaux thermales sont réparties en quatre catégories bien distinctes en fonction de leur température mesurée directement au point de jaillissement. On distingue ainsi les eaux hypothermales, dont la température à l'émergence reste inférieure à celle de la partie supérieure de la zone d'homothermie ou à la température moyenne interannuelle du lieu augmenté de 4°C. À celles-ci s'ajoutent les eaux métriothermales, dont la température est supérieure à 30°C tout en restant en deçà du seuil des eaux hypothermales, puis les eaux mésothermales, définies par une température d'émergence comprise strictement entre 30°C et 50°C. Enfin, cette classification thermique culmine avec les eaux hyperthermales, qui regroupent les sources les plus chaudes dont la température oscille entre 50°C et moins de 100°C.

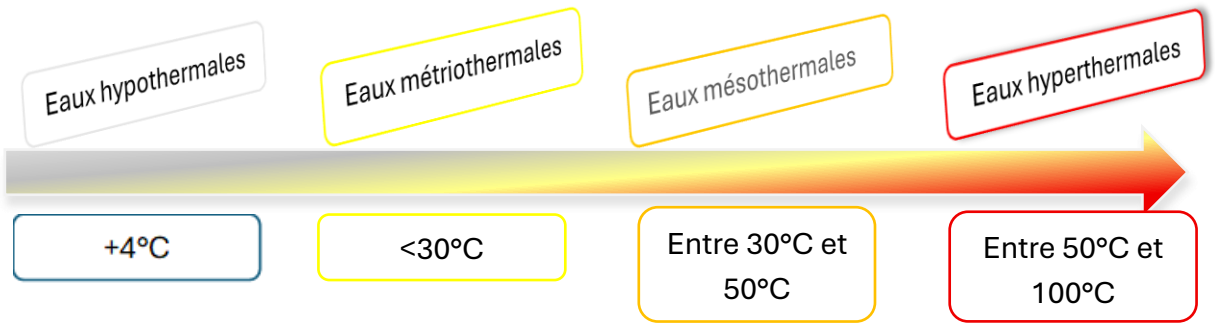


Figure 1 : Représentation schématique des classes thermales des eaux (**Issaâdi ,1992).**

En second lieu, bien que la minéralisation totale soit un indicateur précieux, elle ne permet pas à elle seule de caractériser et de différencier finement les eaux minérales naturelles, car ce paramètre global ne prend pas en considération leur profil chimique qualitatif. C'est pourquoi la classification moderne se base préférentiellement sur la composition en sels minéraux, c'est-à-dire sur la présence quantitative et l'importance de divers anions et cations **(Richard, 1996 ; Roques, 2007)**. Selon l'approche développée par **Georges (2010)**, les eaux sont ainsi subdivisées en six grands groupes chimiques selon la prédominance de leurs éléments. Les eaux sulfurées se caractérisent par une présence marquée de sulfures et d'hydrogène sulfuré avec une teneur supérieure à 0,3 mg/L, tandis que les eaux sulfatées affichent des anions sulfates prépondérants dépassant les 200 mg/L. Les eaux chlorurées sodiques, quant à elles, se définissent par une dominance des anions chlorures supérieure à 250 mg/L et de sodium supérieur à 200 mg/L. Par ailleurs, les eaux bicarbonatées gazeuses se révèlent riches en anions bicarbonates avec des concentrations en hydrogénocarbonate supérieures à 1 g/L et en CO_2 supérieures à 250 mg/L, alors que les eaux ferrugineuses présentent une forte teneur en fer bivalent supérieure à 0,5 mg/L. Ce panorama chimique se complète par les eaux oligométalliques, également qualifiées d'oligominérales, qui sont faiblement minéralisées mais remarquablement riches en oligo-éléments.

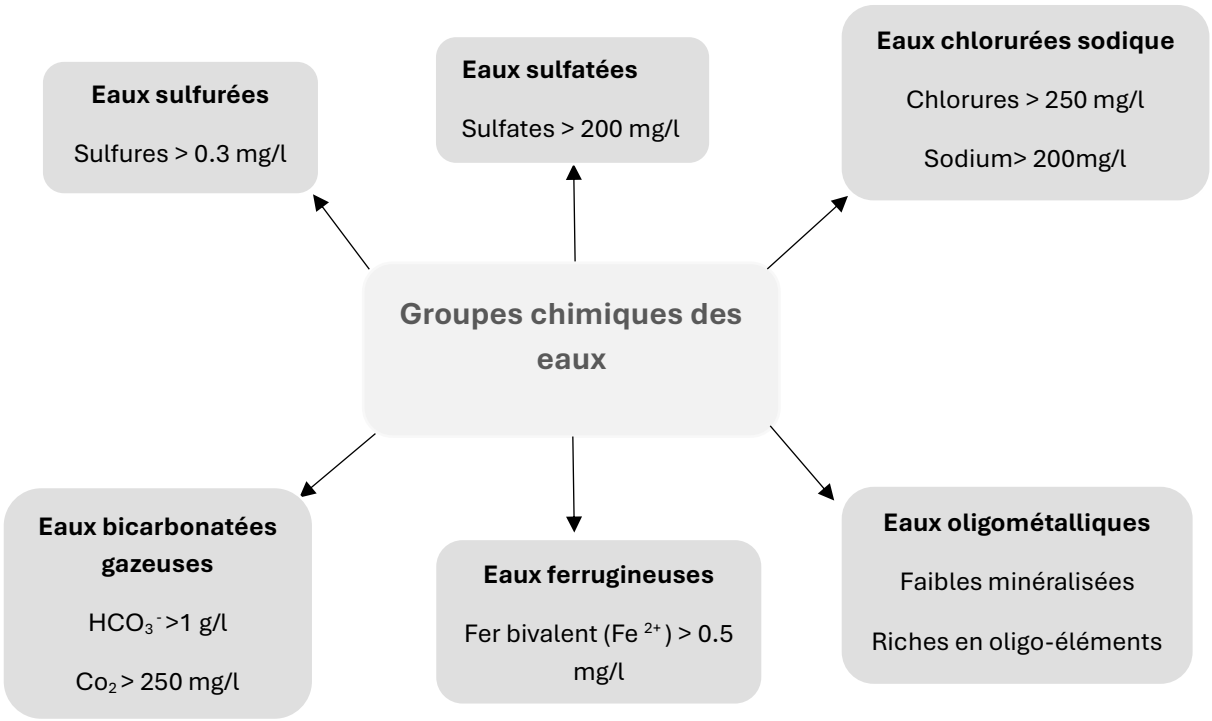


Figure 2 : schéma conceptuel des six grands groupes chimiques des eaux thermales (**Georges, 2010).**

En dernier lieu, la quantité totale de sels minéraux dissous, exprimée par le résidu fixe à 180°C, constitue un facteur de variabilité extrême d'un site à un autre, conférant à chaque source des propriétés uniques. En effet, une eau faiblement minéralisée se caractérise par une résistivité électrique élevée, alors qu'une eau fortement minéralisée présente une conductivité électrique très prononcée. En se basant sur les travaux de **Traissac *et al*., (1999)**, la classification des eaux thermales selon leur charge minérale comprend cinq classes majeures. Les eaux très faiblement minéralisées affichent un taux de résidu fixe inférieur à 50 mg/L, suivies par les eaux faiblement minéralisées ou Oligo-minérales dont la concentration se situe entre 50 mg/L et 500 mg/L. Les eaux moyennement minéralisées présentent une teneur comprise entre 500 mg/L et 1000 mg/L, tandis que les eaux dites simplement minéralisées montrent un taux de sels dissous entre 1000 mg/L et 1500 mg/L. Enfin, les eaux fortement minéralisées regroupent les fluides hautement chargés dont le résidu fixe dépasse largement le seuil des 1500 mg/L.

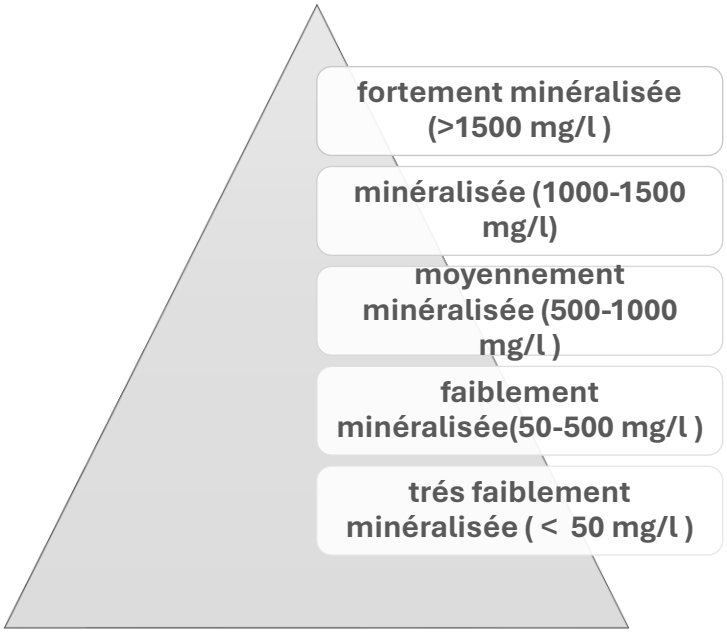


Figure 3 : représentation pyramidale de la classification des eaux thermales selon leur charge minérale (**Traissac *et al*.,1999).**

L'Algérie, par sa position géodynamique active, recèle un patrimoine hydrothermal d'une richesse exceptionnelle, matérialisé par plus de 200 sources thermales inventoriées **(Ouali, 2008)**. Dans la région de l'ouest algérien, et plus précisément au niveau de la wilaya de Tlemcen, deux stations thermales majeures se distinguent par leurs particularités hydrogéologiques et leurs exploitations thérapeutiques traditionnelles : Hammam Boughrara et Hammam Chiguer.

Hammam Boughrara, situé à l'ouest de Tlemcen, est alimenté par des eaux thermo-minérales profondes. Sur le plan de la classification thermique selon **Issaâdi (1992)**, ces eaux sont classées parmi les eaux méso-thermales à hyperthermales, émergeant souvent à des températures oscillant entre 42°C et 45°C. Chimiquement, les études hydrochimiques antérieures indiquent que ces eaux possèdent une minéralisation globale importante, avec un profil à dominance chlorurée sodique et sulfatée calcique, ce qui témoigne d'un lessivage profond des roches sédimentaires carbonatées et évaporitiques lors de leur remontée vers la surface.

Hammam Chiguer (situé près de Maghnia) se caractérise par des propriétés hydrochimiques distinctes. Ses eaux thermo-minérales émergent également à des températures élevées, les classant dans la catégorie des eaux thermales actives. Sur le plan de la composition minérale (classification de **Georges, 2010),** Hammam Chiguer est mondialement ou régionalement connu pour son profil fortement sulfaté et ferrugat-bicarbonaté, conférant à cette source une conductivité électrique et une salinité totale très marquées. Ces conditions physico-chimiques drastiques (chaleur persistante et forte charge minérale) font de ces deux stations de véritables "îlots écologiques extrêmes » (**Issaâdi, 1992)**.

En Algérie, les études portant sur les sources thermales et les microorganismes thermophiles demeurent encore limitées. Pourtant, les bactéries thermophiles représentent un groupe important de microorganismes, notamment en raison de leur aptitude à produire des enzymes présentant un grand intérêt industriel. Dans ce contexte, l’objectif de ce travail consiste à isoler, identifier et caractériser les bactéries thermophiles provenant des sources thermales de Hammam Boughrara et de Hammam Chiguer, afin d’évaluer leur diversité et leur potentiel biotechnologique.

Ce mémoire s'articule autour de trois chapitres. Le premier chapitre présente une introduction générale portant sur une vue globale sur les eaux thermales, la problématique et l'objectif de l'étude. Le deuxième chapitre est consacré aux matériels et méthodes adoptés pour la conduite des travaux expérimentaux. Le troisième chapitre expose les résultats obtenus et à leur discussion.

Matériel et méthodes

II .1 Site d'étude

Les sources thermales de Hammam Boughrara et Hammam Chiguer sont situées dans la wilaya de Tlemcen, au nord-ouest de l'Algérie, à proximité de la région de Maghnia. Selon les travaux de **Bennahia (2020)** et du **CDER (2008),** Hammam Boughrara **(Figure 4)**, localisé à environ 30 km à l'ouest de Tlemcen, se distingue par des eaux mésothermales dont la température varie généralement entre 42°C et 45°C. Ces eaux, fortement minéralisées, sont largement reconnues pour leurs propriétés thérapeutiques, ce qui explique leur fréquentation importante tout au long de l'année

À l'inverse, Hammam Chiguer **(Figure 5)**, situé à quelques kilomètres au nord de Maghnia, présente des eaux thermo-minérales à température plus modérée, également de nature hypothermale , généralement comprise entre 30 et 32 °C, issues d'un contexte géologique distinct dominé par des formations calcaires et marneuses **(Issaâdi, 1992)**. Les caractéristiques géologiques et physico-chimiques propres à ces deux sites confèrent à ces milieux des conditions particulières, favorables au développement d'une microflore spécifique, notamment des micro-organismes thermophiles adaptés aux environnements extrêmes **(Meghroudi, 2022).**

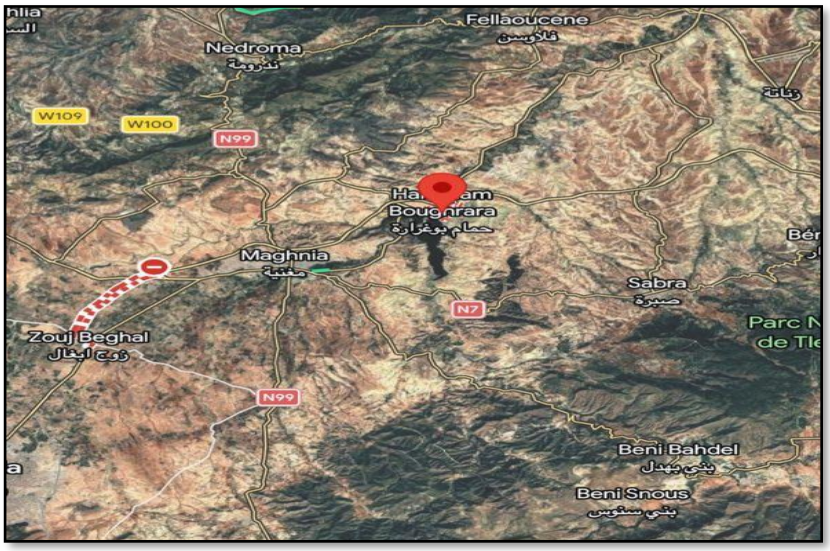


Figure 4 : Localisation géographique de Hammam Boughrara **(Google maps).**

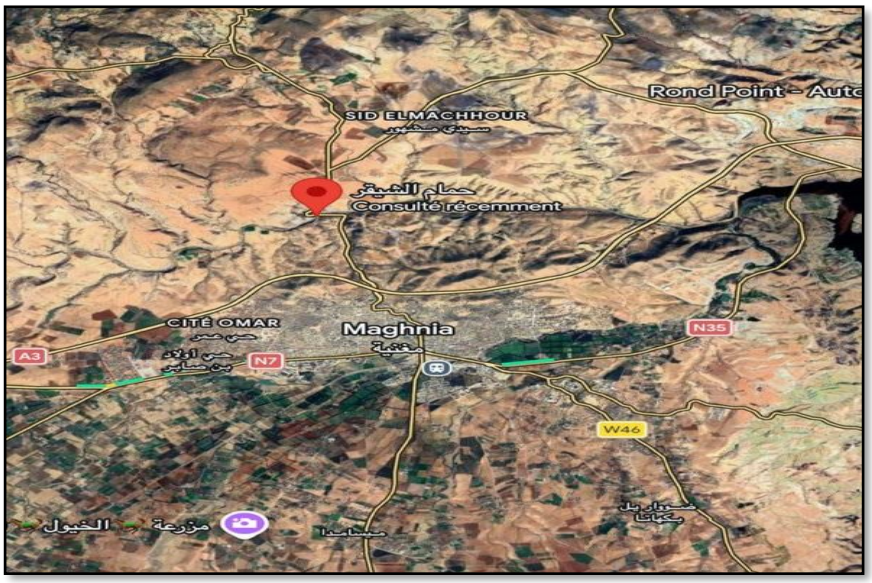


Figure 5 : Localisation géographique de Hammam Chiguer **(Google maps).**

II .2 Matériel

II .2.1 Matériel biologique

- Échantillons d'origine : Matrice d'eaux thermales prélevés au niveau des sources de Hammam Boughrara et Hammam Chiguer (Nord-Ouest algérien).
- Souches de référence : Un panel de neuf (09) souches microbiennes de référence utilisées comme indicateur pour évaluer le potentiel inhibiteur et l'activité antimicrobienne des quatre isolats.

II .2.2 Matériel non biologique

- Instrumentation et appareils : L'étude a mobilisé des étuves thermorégulées (37 °C-50 °C), un autoclave vertical, une balance analytique pour les pesées, un agitateur magnétique chauffant (avec barreaux aimantés), un réfrigérateur pour la conservation des milieux et un microscope optique (\times 100).
- Verrerie, consommables et petit matériel : Les manipulations ont requis des boîtes de Petri en plastique stérile, des tubes à essai en verre, des micropipettes (100 µl et 1000 µl) avec cônes stériles, des anses de platine, des verres à montre, des spatules pour la pesée, des supports (portoirs) pour tubes, des cuvettes de laboratoire et des pissettes d'eau distillée.

- Milieux de culture : L'isolement a été réalisé sur Gélose Nutritive (GN) **(Guiraud, 2012)** et Plate Count Agar (PCA) **(Mora & Arioli, 2014).** L'identification a reposé sur une galerie classique en tubes (TSI, Citrate de Simmons, Eau peptonée, Mannitol-Mobilité) et l'évaluation du potentiel enzymatique sur gélose à l'amidon, gélose à la gélatine, milieu au Tween 80 et gélose au lait écrémé (caséine) et le milieu Muller Hinton pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.
- Réactifs chimiques et indicateurs : Violet de gentiane, Lugol, alcool à 95°, fuchsine, eau oxygénée (H_2O_2 à 3 %), bandelettes oxydase, réactif de Kovacs et disques d'ONPG.

II.3 Méthodes

II.3.1 Procédure de prélèvement et de transport des échantillons

Cette étape est fondamentale pour maintenir l'intégrité des échantillons et assurer la fiabilité des analyses microbiologiques ultérieures. Pour préserver les propriétés naturelles des eaux thermales et éviter tout risque de contamination extérieure, un protocole rigoureux a été adopté **(Benzerfa *et al.*, 2021)**. Afin d'obtenir une image représentative de la biodiversité du réservoir hydrothermal, la collecte a été effectuée le **11 avril 2026** directement au point d'émergence de la source. Notre travail a ciblé deux stations thermales distinctes : Hammam Boughrara **(B)** et Hammam Chiguer **(C).**



Figure 6 : Stations d'échantillonnage et opération de prélèvement des eaux thermales **(Photos personnelle).**

Le prélèvement a été réalisé dans des flacons en verre, préalablement stérilisés à l'autoclave à 121 °C pendant 20 minutes pour garantir l'absence totale de germes contaminants. Lors de la collecte sur le terrain, les flacons ne sont ouverts qu'au tout dernier moment, à proximité immédiate du jet d'eau. Chaque récipient est ensuite rincé trois fois de suite avec l'eau de la source avant le recueil final, en laissant un espace vide en haut du flacon pour faciliter l'homogénéisation de l'échantillon avant l'analyse.



Figure 7 : Remplissage des flacons d'échantillonnage au niveau des sources thermales d'étude **(photo Personnelle).**

Juste après le prélèvement, chaque flacon reçoit une étiquette claire et durable mentionnant le nom précis de la source, la date, l'heure exacte de la collecte, ainsi qu'un code unique pour assurer une traçabilité parfaite. Enfin, le transport vers le laboratoire est effectué en plaçant les flacons verticalement dans une glacière isotherme propre. Le maintien d'une température stable entre 4 °C et 6 °C est assuré par des blocs de glace, ce qui est nécessaire pour ralentir le métabolisme des bactéries mésophiles et stabiliser la population microbienne **(De Vos et al., 2000)**.



Figure 8 : Conservation des échantillons en enceinte isotherme (+4°c) durant le transfert vers le laboratoire **(photo personnelle)**.

II.3.2 Isolement ; purification et conservation des isolats

II.3.2.1 Isolement des souches bactériennes

Le travail expérimental a été réalisé sur des échantillons d'eaux thermales collectés au niveau des sources de Hammam Boughrara **(B)** et de Hammam Chiguer**(C)**. Ces sites ont été sélectionnés en raison de l'absence de données microbiologiques approfondies les concernant.

La démarche dédiée à l'obtention de cultures pures a débuté par une phase d'isolement primaire, visant à séparer les différents micro-organismes présents dans l'échantillon. Pour ce faire, une gamme de dilutions décimales a été préparée en utilisant de l'eau physiologique stérile (NaCl 0,9%) comme diluant, afin de réduire la densité microbienne et de favoriser l'individualisation des colonies. Le processus a consisté en des transferts successifs jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-3}.

Ensuite, un volume de 100 µl de cette suspension a été prélevé et inoculé par la technique d'étalement en surface sur deux milieux de culture solides non sélectifs : GN et le milieu PCA. Ces supports ont été choisis pour leur capacité à soutenir la croissance d'une vaste diversité de germes **(Guiraud, 2012)**. Le dispositif expérimental utilisé lors de cette étape d'ensemencement est illustré par la **Figure 9.**

Après l'ensemencement, les boîtes de Pétri ont été soumises à une incubation aérobie à une température contrôlée de 45 °C pendant une période s'étalant de 24 h à 5jours. Ce choix thermique est stratégique, car il permet de cibler spécifiquement les bactéries présentant un caractère thermotolérant ou thermophile modéré **(Mora & Arioli, 2014)**.

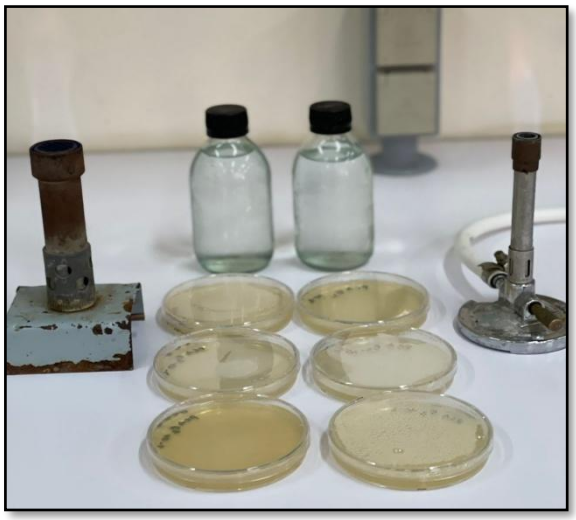


Figure 9 : Ensemencement de l'eau sur milieux GN et PCA **(photo personnelle).**

II.3.2.2 Purification

L'obtention de cultures pures constitue une étape préliminaire impérative avant toute investigation biochimique ou moléculaire. Ce processus garantit que les analyses ultérieures sont réalisées sur des isolats homogènes, évitant ainsi toute interférence liée à une contamination croisée.

Sur le plan expérimental, la purification a été conduite selon la technique des stries d'épuisement (méthode des trois secteurs). Cette méthode permet d'isoler des colonies individuelles à partir d'une biomasse dense. L'opération a été réitérée à deux ou trois reprises pour chaque isolat sur les milieux de base (GN et PCA), jusqu'à l'obtention d'une uniformité macroscopique totale **(Sanders, 2012).**

À l'issue de cette phase, la pureté a été confirmée par une observation macroscopique minutieuse. Les isolats présentant une pureté macroscopique totale ont été retenus pour la suite des caractérisations.

II.3.2.3 Conservation des cultures pures

Pour assurer la viabilité à long terme de nos souches thermophiles après confirmation de leur pureté, les cultures pures ont été conservées dans des tubes Eppendorf stériles. Conformément aux protocoles de **Gherna (1981)**, les suspensions bactériennes ont été additionnées de glycérol stérile comme agent cryoprotecteur, afin de prévenir la lyse cellulaire induite par la formation des cristaux de glace. Comme le soulignent **Goldman et Green (2015),** ce mélange a été stocké à -20°C pour stopper le métabolisme bactérien tout en stabilisant les caractéristiques physiologiques et enzymatiques des isolats. Cette approche méthodologique permet, selon les critères de **Snell (1984)**, de maintenir les cellules dans un état de quiescence optimal, garantissant ainsi la pérennité et la reproductibilité des analyses ultérieures.

II.3.3 Identification

II.3.3.1 Étude Macroscopique

L'examen des colonies à l'œil nu ou à la loupe binoculaire permet de définir des critères visuels standardisés. Selon **Thomas *et al*., (1970)**, ces paramètres macroscopiques sont essentiels pour orienter le diagnostic microbiologique. Les critères d'identification retenus pour notre étude sont les suivants :

- La Forme et le Contour : La configuration générale de la colonie (circulaire, irrégulière, filamenteuse ou rhizomorphe) ainsi que l'aspect de ses bords.

- La Taille : Le diamètre des colonies, classé en trois catégories : petite, moyenne ou grande.
- Le Relief (Élévation) : La projection verticale de la colonie par rapport à la surface du milieu (plate, bombée, convexe, ombonée).
- L'Aspect de la surface : La texture visuelle de la biomasse (lisse, rugueuse, brillante, mate, muqueuse ou sèche).
- Les Propriétés Optiques : Le degré de passage de la lumière (Opacité) : transparente, translucide ou opaque.
- La Pigmentation (Couleur) : La coloration naturelle de la colonie (blanche, crème, jaune, rose, rouge...).
- La Consistance : La texture physique de la colonie lors de sa manipulation avec l'anse (crémeuse, visqueuse, cassante ou sèche).

II.3.3.2 Observation microscopique

II.3.3.2.1 Principe de la coloration de Gram

La coloration de Gram est une technique de coloration différentielle fondamentale. Elle permet de distinguer les bactéries en fonction des propriétés physico-chimiques de leurs parois **(Tortora *et al*., 2016)**. Cette méthode repose sur l'utilisation successive de colorants et d'un agent décolorant ،permettant de classer les isolats en deux catégories : Gram + et Gram - **(Guiraud, 2012)**.

II.3.3.2.2 Protocole expérimental de la coloration de Gram

La procédure a été réalisée suivant une succession d'étapes rigoureuses afin d'assurer la fiabilité des résultats :

- **Préparation et fixation du frottis :** Une goutte de suspension bactérienne a été déposée de manière aseptique sur une lame porte-objet propre, puis étalée uniformément. Après séchage à l'air libre, le frottis a été fixé par passage rapide dans la flamme d'un bec Bunsen pour assurer l'adhérence des cellules à la lame **(Sanders, 2012).**
- **Coloration primaire :** Le frottis fixé a été recouvert de Violet de Gentiane pendant une minute, suivi d'un rinçage à l'eau distillée. Cette étape colore l'ensemble des cellules en violet.

- **Mordançage :** L'application du Lugol (solution iodo-iodurée) pendant une minute a permis de former un complexe insoluble avec le colorant primaire à l'intérieur du cytoplasme.
- **Décoloration :** Cette étape critique a été réalisée par un lavage bref à l'alcool (95°) jusqu'à l'élimination de l'excès de colorant. Cette phase permet de différencier les bactéries selon la perméabilité de leur paroi.
- **Contre-coloration :** Enfin, l'application d'un colorant de contraste, la Fuchsine (ou Safranine), pendant 30 à 60 secondes a permis de colorer les éléments précédemment décolorés.
- **Après séchage** : Les lames ont été observées au microscope optique sous objectif à immersion (×100) pour une analyse détaillée de la morphologie et du type de paroi de chaque souche.

II.3.4 Étude des paramètres de croissances

L'optimisation et la détermination des limites de tolérance des isolats constituent une étape cruciale pour définir leur profil écologique et physiologique **Benkahoul *et al*., (2017)**

II.3.4.1 Influence de la température (T°)

La caractérisation du profil thermique des quatre souches bactériennes a été réalisée par une méthode de culture sectorielle sur GN. Pour ce faire, chaque boîte de Pétri a été rigoureusement partagée en quatre secteurs distincts, puis ensemencée par une strie en zigzags propre à chaque isolat **(Wiley *et al*., 2019)**. Afin de déterminer les températures cardinales de croissance, les cultures ainsi préparées ont été incubées simultanément dans des étuves réglées à 30 °C, 37 °C, 45 °C et 55 °C durant une période allant de 24 à 48 heures **(Madigan *et al*., 2020).**

II.3.4.2 Influence de la salinité (NaCl)

Parallèlement à l'étude thermique, l'effet de la pression osmotique sur le développement des quatre isolats bactériens a été évalué en modifiant la concentration en chlorure de sodium (NaCl) du milieu de culture. Pour ce faire, des boîtes de GN ont été préparées en ajustant les concentrations finales en NaCl à 1,5%, 4% et 9% (w/v). La face inférieure de chaque boîte a été segmentée géométriquement en quatre quadrants égaux, où chaque secteur a été inoculé par une strie en zigzags propre à une souche spécifique **(Wiley**

***et al*., 2019)**. Les cultures ont été ensuite incubées à la température 45C° pendant 48 heures **(Madigan *et al*., 2020).**

II.3.4.3 Influence du potentiel Hydrogène (pH)

Afin de tester la capacité de développement des isolats face aux contraintes de pH, des milieux gélose nutritive ont été préparés et calibrés aux valeurs de 4, 7et 9 par adjonction de solutions de (HCL) ou de (NaOH) **(Krulwich *et al*., 2011).** L'inoculation a été menée sur des boîtes de Pétri préalablement divisées en quadrants, en réalisant des stries sinueuses pour chaque souche pure. L'ensemble des boîtes a été soumis à une incubation thermique à une température constante de 45°C durant 24 à 48 heures **(Padan *et al*., 2005)**. Au terme de cette période, l'intensité du développement bactérien a été estimée macroscopiquement par observation visuelle directe de la biomasse afin de définir le comportement physiologique de chaque isolat.

II.3.5 Recherches des enzymes respiratoires

II.3.5.1 La catalase

Le test de la catalase est une étape clé de l'identification biochimique permettant de détecter la présence d'une enzyme capable de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Chez les bactéries, cette enzyme joue un rôle protecteur essentiel en transformant ce composé toxique en eau et en oxygène selon la réaction :

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O+O_2$$

Ce paramètre enzymatique est une référence classique pour différencier les grands groupes bactériens.

La manipulation s'effectue en déposant une goutte d'eau oxygénée (10 volumes) sur une lame de verre. Une petite quantité de culture pure est ensuite mélangée à la solution. L'interprétation est immédiate

Réaction positive (une production rapide de bulles (effervescence) témoigne de la libération d'oxygène gazeux) Réaction négative (l'absence de bulles indique que l'isolat ne possède pas l'enzyme catalase **(Gerhardt *et al*., 1994))**

II.3.5.2 Test oxydase (Technique sur bandelette)

L'évaluation de l'activité oxydasique des isolats a été réalisée via l'utilisation de bandelettes réactives prêtes à l'emploi, permettant une détection rapide et précise de la cytochrome oxydase. Ce dispositif analytique repose sur un support cellulosique imprégné de réactifs chromogènes qui s'oxydent en présence de l'enzyme respiratoire ciblée **(Cypress Diagnostics, 2023)**. Le protocole opératoire a consisté à humidifier légèrement la zone active de la bandelette avec une goutte d'eau distillée stérile afin de réactiver les réactifs, puis une colonie bactérienne fraîche a été prélevée, à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée pour éviter toute interférence métallique, avant d'être étalée directement sur la zone imbibée. L'interprétation des résultats s'est appuyée sur la cinétique de réaction chromatique un virage rapide vers une teinte bleu-violacé intense au point de contact confirme le caractère oxydase positif de la souche **(Gerhardt *et al*., 1994)**, tandis que l'absence de changement de couleur témoigne de l'absence de l'enzyme chez l'isolat.

II.3.5.3 Test ONPG

La recherche de l'enzyme β-galactosidase constitue une étape clé dans l'identification biochimique des isolats **(Lederberg, 1950 ; MacFaddin, 2000)**. Cette analyse repose sur l'utilisation de l'ortho-nitrophényl-β-D-galactopyranoside (ONPG), un substrat incolore dont la structure est analogue à celle du lactose. Lorsqu'une bactérie possède cette hydrolase, elle rompt la liaison osidique de l'ONPG pour libérer du galactose et de l'ortho-nitrophénol, un composé qui se manifeste par une coloration jaune caractéristique **(MacFaddin, 2000)**.

Sur le plan opératoire, le protocole consiste à préparer une suspension bactérienne dense dans de l'eau physiologique stérile, puis à y introduire un disque imprégné d'ONPG à l'aide d'une pince flambée. Après une période d'incubation de 24h à 45°C, la lecture est effectuée : l'apparition d'une teinte jaune confirme la présence de l'enzyme (ONPG +), tandis qu'une absence de changement de couleur indique un résultat (-).

Cette méthode présente l'avantage majeur de détecter l'activité enzymatique indépendamment de la présence d'une perméase membranaire.

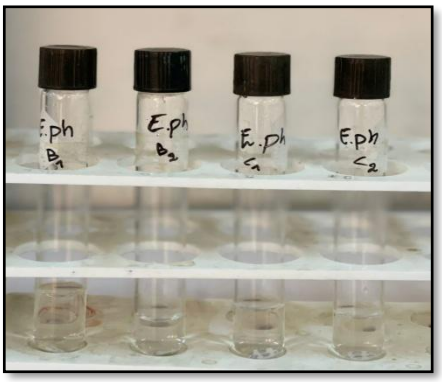


Figure 10 : Mise en contact des disques d'ONPG avec les suspensions bactériennes pour le test de la β-galactosidase **(Photo personnelle).**

II.3.6 Etude des caractères biochimiques

II.3.6.1 Test à l'indole

Le test de l'indole est une épreuve biochimique fondamentale visant à évaluer l'activité métabolique des isolats, plus précisément leur capacité à synthétiser la tryptophanase **(Meziani, 2012)**. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse du tryptophane, un acide aminé essentiel présent dans le milieu de culture ،pour libérer de l'indole comme métabolite terminal. Sur le plan opératoire ،le protocole consiste à ensemencer chaque souche pure dans de l'eau peptonée riche en tryptophane, suivie d'une incubation à 45 °C pendant 24 à 48 heures afin de permettre l'accumulation du produit de dégradation **(Boudraa *et al*., 2011)**. La révélation se fait par l'ajout délicat de quelques gouttes de réactif de Kovacs (contenant du p-diméthylaminobenzaldéhyde) à la surface de la culture. L'apparition immédiate d'un anneau rouge au sommet du tube confirme la présence d'indole et donc la positivité du test ، tandis qu'un résultat négatif se traduit par le maintien de la coloration jaune initiale du réactif **(Meziani, 2012)**.

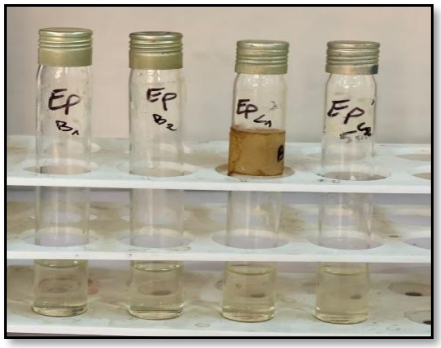


Figure 11 : Culture des isolats dans l'eaux peptonée pour la recherche de la production d'indole **(photo personnelle).**

II.3.6.2 Test de Mannitol-Mobilité

Le test de Mannitol-Mobilité repose sur l'utilisation d'un milieu semi-solide combiné permettant d'évaluer simultanément deux caractères biochimiques essentiels : la fermentation d'un glucide spécifique et la capacité de déplacement de la bactérie **(Meziani, 2012)**. D'une part, la fermentation du mannitol est mise en évidence par le virage du milieu du rouge au jaune ،indiquant une acidification par l'isolat. D'autre part ،la mobilité est observée après un ensemencement par piqûre centrale à l'aide d'une pipette pasteur, suivi d'une incubation à 45 °C pendant 24 heures. Une diffusion de la culture créant un trouble ou un voile au-delà de la ligne d'inoculation confirme la mobilité de la souche ،tandis qu'une croissance strictement limitée à la ligne de piqûre indique un caractère immobile **(Tortora *et al*., 2016).**

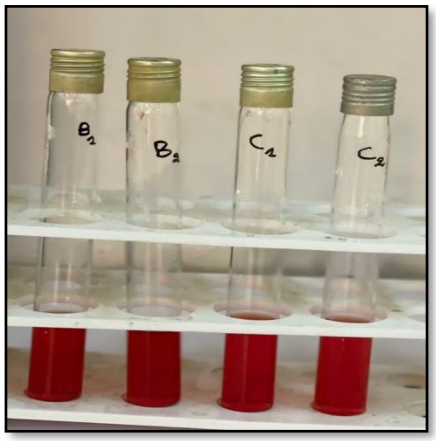


Figure 12 : Ensemencements des isolats (B1, B2, C1, C2) dans le milieu semi-solide Mannitol -Mobilité **(photo personnelle).**

II.3.6.3 Citrate de Simmons

Le test au citrate de Simmons est une épreuve biochimique sélective utilisée pour déterminer la capacité d'une souche bactérienne à utiliser le citrate comme unique source de carbone et d'énergie pour son métabolisme **(Arlet & Champs, 2009)**. Ce processus est rendu possible grâce à une enzyme spécifique, la citrate perméase, qui facilite le transport du citrate à l'intérieur de la cellule où il est hydrolysé en acide pyruvique et en dioxyde de carbone (CO_2). La production de CO_2, en réagissant avec les composants sodiques du milieu, entraîne une alcalinisation qui fait passer l'indicateur de pH, le bleu de bromothymol, de sa couleur initiale verte vers un bleu intense **(Meziani, 2012 ; Tortora *et al*., 2016).**

Sur le plan pratique, l'ensemencement est réalisé par une strie longitudinale sur la pente du milieu incliné à l'aide d'un fil droit, à partir d'une suspension bactérienne préparée au préalable **(Boudraa *et al*., 2011)**. Après une période d'incubation à 45 °C pendant 24 heures (pouvant se prolonger jusqu'à 4 jours pour les souches à métabolisme lent), la lecture est effectuée : un virage au bleu confirme la positivité du test (Citrate +), tandis que le maintien de la couleur verte indique un résultat -.

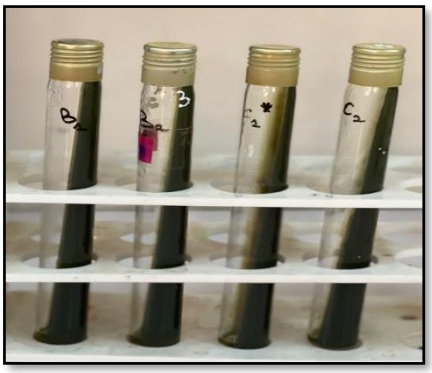


Figure 13 : Ensemencement des isolats bactériens sur milieu citrate de Simmons incliné **(photo personnelle).**

II.3.6.4 Test sur milieu Triple Sugar Iron (TSI)

Le milieu TSI est utilisé pour étudier le métabolisme glucidique des souches isolées **(Meziani, 2012)**. Ce milieu contient trois sucres : le glucose, le lactose et le saccharose. Selon leurs capacités enzymatiques, les bactéries utilisent d'abord le glucose, puis le lactose ou le saccharose, et enfin les peptones si les sucres sont épuisés.

L'ensemencement se fait par une piqûre dans le culot du tube suivie d'une strie sur la pente. Après 24 heures d'incubation à 45 °C, les résultats sont lus grâce au changement de couleur de l'indicateur (rouge de phénol) :

- Couleur jaune : indique la fermentation des sucres (acidification).
- Précipité noir : indique la production d'hydrogène sulfuré (H_2S).
- Bulles ou cassures : indiquent une production de gaz.

Ce test permet donc de caractériser précisément le profil biochimique de chaque isolat **(Arlet & Champs, 2009 ; Tortora *et al*., 2016)**.

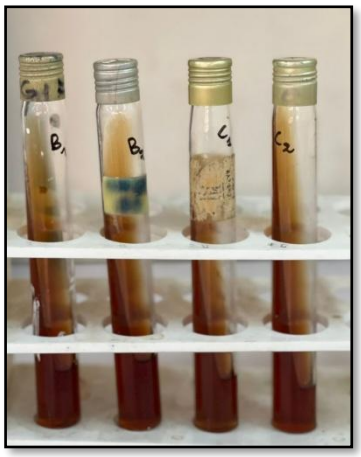


Figure 14 : Inoculation des isolats bactériens sur le milieu différentiel Triple Sugar Iron (TSI) par piqûre profonde et stries sur pente **(photo personnelle).**

II.3.7 Mise en évidence des activités enzymatiques extracellulaires

Afin d'explorer les propriétés enzymatiques des quatre isolats bactériens thermotolérants, quatre substrats distincts ont été exploités : l'amidon, la gélatine, le lait écrémé et le Tween 80. Cette caractérisation fonctionnelle a été menée sur l'ensemble des souches pures isolées **(Benammar *et al*., 2020)**.

II.3.7.1 Recherche de l'activité amylolytique

La production d'amylases a été recherchée sur un milieu de gélose nutritive (GN) enrichi en amidon soluble à une concentration finale de 1 % (w/v). L'inoculation a été réalisée en pratiquant une strie centrale unique propre à chacun des quatre isolats à la surface du milieu. Les boîtes ont ensuite été soumises à une incubation thermique à une température constante de 45°C pendant une période allant de 24 à 48 heures **(Benammar *et al*., 2020)**.

Après incubation, la révélation de l'hydrolyse enzymatique a été effectuée en recouvrant la surface de la gélose avec une solution d'iode de Lugol. La présence d'une zone translucide (halo de clairance) autour de la colonie, contrastant avec la coloration bleu-sombre du reste du milieu, indique la dégradation de l'amidon et confirme le caractère amylolytique positif de la souche **(Benammar *et al*., 2020).**

II.3.7.2 Activités protéolytiques (Protéases)

L'activité protéolytique globale est évaluée par la dégradation de deux substrats

II.3.7.2.1 Hydrolyse de la Caséine

L'évaluation de l'activité protéolytique ou caséinolytique globale des quatre isolats bactériens thermotolérants a été réalisée par l'analyse de leur capacité à dégrader la caséine **(Guta *et al*., 2024)**. Le milieu de culture a été préparé par addition de lait écrémé stérile à une concentration finale de 5 % (v/v) au sein d'une gélose nutritive de base, faisant office de substrat protéique. L'inoculation a été opérée à la surface des boîtes de Pétri en pratiquant une unique strie rectiligne simple pour chaque souche pure. Les cultures ont ensuite été soumises à une incubation thermique à une température constante de 45 °C pendant une période allant de 24h à 48 heures.

Lecture et révélation du test : Elle repose sur un examen macroscopique visuel direct du milieu. Le développement d'une zone claire et translucide (halo de clarification périphérique) entourant la strie de croissance bactérienne constitue une indication claire de la dégradation de la caséine et valide le caractère protéolytique positif de la souche **(De Vos *et al*., 2009 ; Guta *et al*., 2024).** À l'inverse, le maintien de l'opacité initiale du milieu autour de l'isolat traduit une absence d'activité enzymatique extracellulaire.

II.3.7.2.2 Hydrolyse de la Gélatine (Gélatinase) par la Méthode de Frazier

La mise en évidence de la sécrétion de gélatinases par les quatre isolats thermotolérants a été conduite sur un milieu solide composé de gélose nutritive additionnée de gélatine à une concentration finale de 2 % (w/v). L'ensemencement a été réalisé de manière standardisée en traçant une unique ligne droite centrale (strie rectiligne simple) à la surface du milieu pour chaque culture pure. Les boîtes de Pétri ont ensuite été disposées en incubateur thermique à une température régulée de 45 °C pendant 24h à 48h.

Lecture et révélation du test : L'évaluation phénotypique s'effectue par un suivi macroscopique direct des boîtes après la phase d'incubation. Le développement d'une zone de clarification translucide (halo de transparence périphérique) contrastant avec le fond opaque de la gélose confirme l'hydrolyse enzymatique du polymère et qualifie l'isolat analysé de gélatinase-positif **(Benammar *et al*., 2020)**. À l'inverse, la persistance de l'opacité originelle de la gélose tout autour de la zone de croissance indique un résultat négatif.

II.3.7.3 Activités lipolytiques (Lipases – Tween 80)

La recherche du potentiel enzymatique estérasique des quatre isolats bactériens thermotolérants a été menée afin d'évaluer leur aptitude à hydrolyser les liaisons esters en utilisant le Tween 80 comme substrat cible à 1% **(Benammar *et al*., 2020)**. La manipulation a été conduite sur un milieu de culture gélosé d'isolement modifié et supplémenté en Tween 80. L'inoculation a été réalisée à la surface de la gélose en pratiquant une unique strie rectiligne simple pour chaque souche pure. Les boîtes ont ensuite été soumises à une incubation thermique à une température constante de 45 °C pendant une période allant de 24h à 48 heures.

Lecture et révélation du test : Elle s'effectue par un examen macroscopique visuel direct des zones de culture après la phase d'incubation. L'apparition d'un précipité opaque bien visible, disposé tout autour du cordon de croissance bactérienne, signe la dégradation effective du substrat et valide formellement l'activité estérase-positive de l'isolat étudié **(Saidan *et al*., 2024)**. À l'inverse, le maintien de la limpidité initiale du milieu traduit un résultat négatif

II.3.8 Évaluation de l'activité antimicrobienne

L'étude du potentiel antimicrobien de nos quatre (04) isolats thermophiles a été réalisée afin de mettre en évidence leur capacité à inhiber la croissance des micro-organismes pathogènes. Pour ce faire, le pouvoir inhibiteur de ces souches a été testé vis-à-vis d'un panel de neuf (09) souches tests de référence (08 souches bactériennes et la levure *Candida albicans*) par la méthode des disques d'agar (Agar-discs method).

Tableau 1 : Souches de référence et milieux de culture utilisés dans le test d'activité antimicrobienne

Microorganismes	Milieu de culture	Référence
Bactérie à Gram positif		
Bacillus cereus	Mueller-Hinton Agar (MHA)	ATCC 11778
Bacillus subtilis	Mueller-Hinton Agar (MHA)	ATCC 6633
Enterococcus faecalis	Mueller-Hinton Agar (MHA)	ATCC 29212
Staphylococcus aureus	Mueller-Hinton Agar (MHA)	ATCC 25923
Micrococcus luteus	Mueller-Hinton Agar (MHA)	ATCC 15307
Bactérie à Gram négatif		
Escherichia coli	Mueller-Hinton Agar (MHA)	ATCC 25922
Klebsiella pneumoniae	Mueller-Hinton Agar (MHA)	ATCC 70603
Pseudomonas aeruginosa	Mueller-Hinton Agar (MHA)	ATCC 27853
Levure		
Candida albicans	Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	ATCC 10231

II.3.8.1 Préparation et standardisation de l'inoculum tests

Les suspensions microbiennes ont été préparées à partir de cultures jeunes (18 à 24 h) dans du bouillon Mueller-Hinton (MH) pour les souches bactériennes, et sur un milieu adapté pour la levure. La densité cellulaire de chaque inoculum a été ajustée par spectrophotométrie par rapport à l'étalon 0,5 de Mc Farland **(Cavalla & Eberlin, 1994)**. Les valeurs de la densité optique (DO) ont été fixées entre 0,08 et 0,10 (à 625 nm) pour les bactéries (soit environ 10^8 UFC/ml), et entre 0,12 et 0,15 (à 530 nm) pour la souche de *Candida albicans* (soit environ 10^6 UFC/ml).

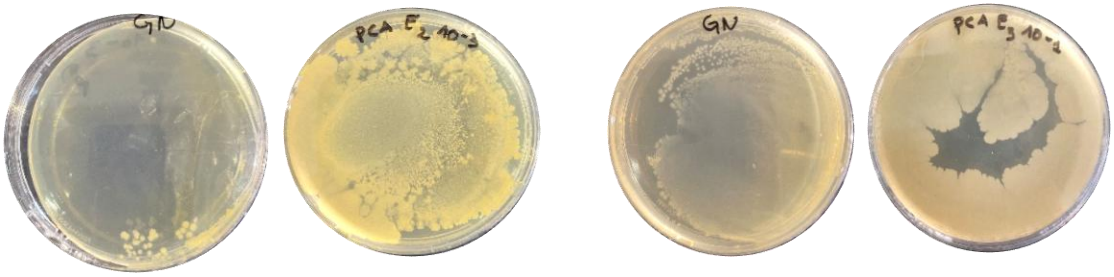
II.3.8.2 Méthode des disques d'agar (Agar-discs method)

Le potentiel antimicrobien des quatre (04) isolats thermophiles a été évalué vis-à-vis d'un panel de neuf (09) souches tests de référence selon le protocole décrit par **(Bramki, 2019)**. Pour ce faire, les suspensions microbiennes préalablement ajustées ont été ensemencées uniformément en tapis par écouvillonnage à la surface des boîtes de gélose Mueller-Hinton (MH) et Sabouraud Dextrose Agar (SDA) **(CLSI, 2020).** Successivement, des disques de gélose de 6 mm de diamètre, prélevés délicatement à l'emporte-pièce à partir des cultures pures de nos quatre (04) isolats thermaux, ont été déposés à la surface du milieu ensemencé à raison de quatre (04) disques disposés par boîte, permettant ainsi de tester simultanément tous les isolats contre une seule souche cible. Afin d'optimiser la migration radiale des substances bioactives, une étape de pré-diffusion thermique à 4°C pendant 4 heures a été respectée avant de soumettre les boîtes à une incubation finale à 37°C durant 18 à 24 heures **(Bramki, 2019).** À l'issue de cette période, l'activité antimicrobienne a été déterminée macroscopiquement par l'apparition des halos clairs entourant les disques, dont les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés avec précision et exprimés en millimètres (mm) conformément aux standards internationaux

Résultats et discussion

III.1 Isolement

Les résultats de l'isolement primaire, mené à partir des échantillons d'eaux thermales de Hammam Boughrara et Hammam Chiguer, révèlent une croissance bactérienne remarquable. Comme le montre **la Figure 15**, cette croissance s'est traduite par l'apparition d'une charge coloniale dense, reflétant la richesse biologique de ces biotopes.



Echantillon B (Boughrara) Echantillon C (Chiguer)

Figure 15 : Résultat de l'isolement primaire des échantillons d'eau de Boughrara (B) et Chiguer (C) sur milieux de culture Solides **(Photo personnelle)**.

L'analyse de cette étape met en évidence l'existence d'une microflore indigène hautement adaptée aux conditions hydrothermales. La capacité de ces entités cellulaires à proliférer activement lors de l'isolement confirme leur nature thermophile ou thermotolérante, façonnée par les contraintes physico-chimiques de leurs niches écologiques d'origine.

Sur le plan académique, il est capital de souligner l'originalité de ces résultats. Contrairement à d'autres stations thermales algériennes qui ont fait l'objet de nombreuses investigations microbiologiques, les sources de Hammam Boughrara et Hammam Chiguer restent très peu explorées. De ce fait, la réussite de cet isolement primaire constitue une contribution préliminaire inédite, apportant de nouvelles données concrètes sur la biodiversité bactérienne de l'ouest algérien et ouvrant des perspectives prometteuses pour l'exploration de leur potentiel biotechnologique.

III.2 La purification

L'uniformité macroscopique observée sur les différents milieux de culture confirme la pureté des isolats B1, B2, C1 et C2. Le fait que chaque boîte de Pétri présente une population coloniale monomorphe atteste de l'absence de toute contamination exogène.

Cette stabilité phénotypique au sein de chaque culture démontre que les isolats sont issus d'une seule unité formatrice de colonie (UFC). Par conséquent, cette pureté garantie et valide la fiabilité des identifications biochimiques ultérieures, indispensables à la caractérisation de ces bactéries thermophiles issues de Hammam Boughrara et Hammam Chiguer (**Figure 16).**

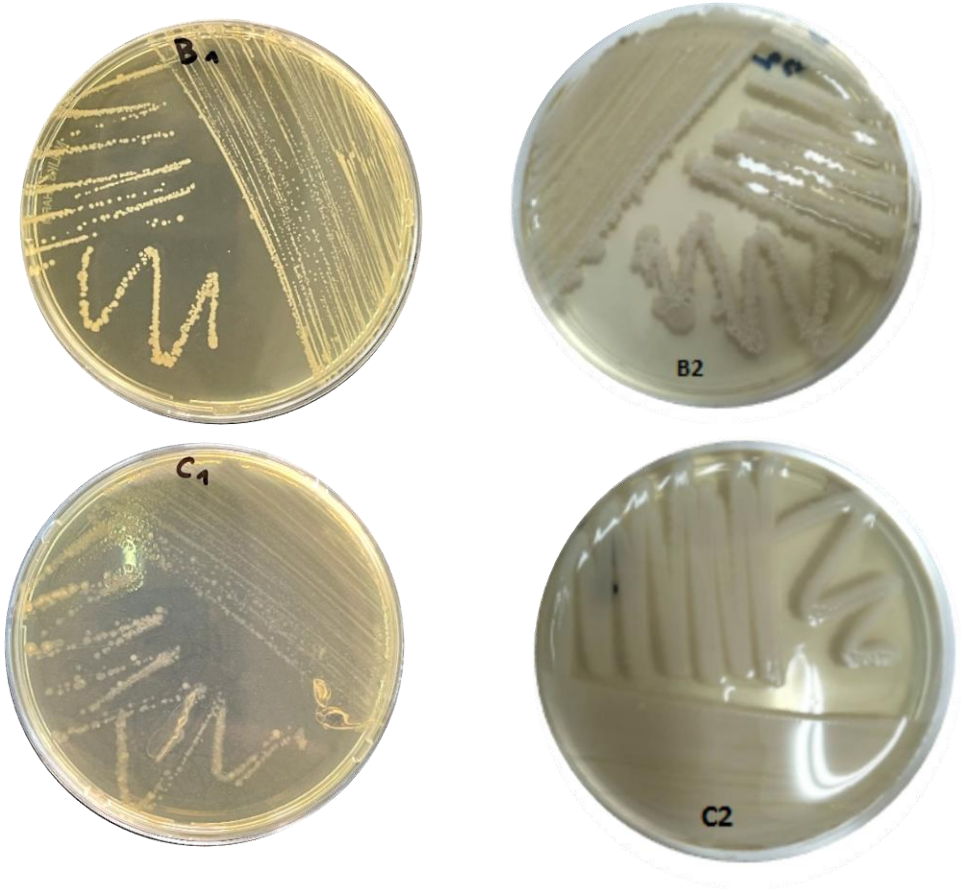


Figure 16 : Souches purifiées (B1, B2, C1 et C2) obtenues par méthode des stries sur milieu solide **(Photo personnelle).**

III.3 Identification

III.3.1 Etude macroscopique

Le tableau ci -dessous **(Tableau 2)** résume les observations macroscopiques détaillées pour chaque souche après 48h d'incubation à 45°C sur GN. L'aspect des colonies bactériennes a été déterminé selon les critères de base décrits par **Harley et Prescott (2002)**

Tableau 2 : Caractéristiques macroscopiques des souches B1, B2, C1 et C2.

	Forme	**Relief**	**Contour**	**Taille**	**Surface**	**Opacité**	**Couleur**	**Consistance**
B1	Circulaire	Bombé	Régulier	Petite	Lisse et brillante	Opaque	Blanche Crème	Crémeuse
B2	Circulaire	Plate	Irrégulier	Petite à moyenne	Lisse et brillante	Opaque	Blanche	Crémeuse
C1	Irrégulier	Bombé	Régulier	Petite	Lisse et brillante	Opaque	Incolore	Visqueuse
C2	Irrégulier	Plate	Irrégulier	Petite à moyenne	Lisse e brillante	Transluci de	Beige	Crémeuse

III.3.2 Etude microscopique

L'analyse microscopique réalisée après coloration de Gram **Tableau 3**, **Figure 17** met en évidence une nette uniformité cellulaire entre nos quatre isolats (B1, B2, C1 et C2). L'observation révèle, que toutes les souches se composent de bacilles à Gram + (teintés en violet). Malgré cette similitude morphologique, leurs modes d'arrangement spatial divergent selon leur site de prélèvement. Les bactéries de Hammam Boughrara se caractérisent par des structures simples, où B1 et B2 s'agencent principalement de façon isolée ou en paires. À l'inverse, les souches de Hammam Chiguer évoluent vers des formes de regroupement plus complexes ; C1 forme de longs filaments chaînés enchevêtrés tandis que C2 s'organise en amas cellulaires denses et entrelacés.

Cette prédominance de bacilles Gram + au sein d'écosystèmes hydrothermaux s'accorde pleinement avec les conclusions de **Larbi Daoudji (2015).** En étudiant la diversité de 59 souches issues de diverses sources thermales algériennes (Hammam Debagh, Hammam Bouhnifia, Hammam Bouhjar, Hammam Rabi et Hammam Righa), elle avait

également démontré qu'une large majorité (44 isolats) partageait ce même morphotype bacillaire.

La persistance de ces structures cellulaires en conditions extrêmes confirme leur excellente adaptation face aux fortes contraintes thermiques de Hammam Boughrara et Hammam Chiguer. Sur le plan taxonomique, ces critères microscopiques constituent une signature classique fortement indicative du genre Bacillus, une orientation phénotypique qui sera validée par les galeries d'identification biochimique ultérieures.

Tableau 3 : Caractéristiques microscopique des isolats thermophiles

Isolats	Morphologie	Réaction au gram	Arrangement des cellules
B1	Bacilles	Gram +	Majoritairement isolés ou en paires
B2	Bacilles	Gram+	Isolés, en paires
C1	Bacilles	Gram+	Isolés, en paires et en longues chaines enchevêtrées
C2	Bacilles	Gram+	Amas denses et chaines enchevêtrées

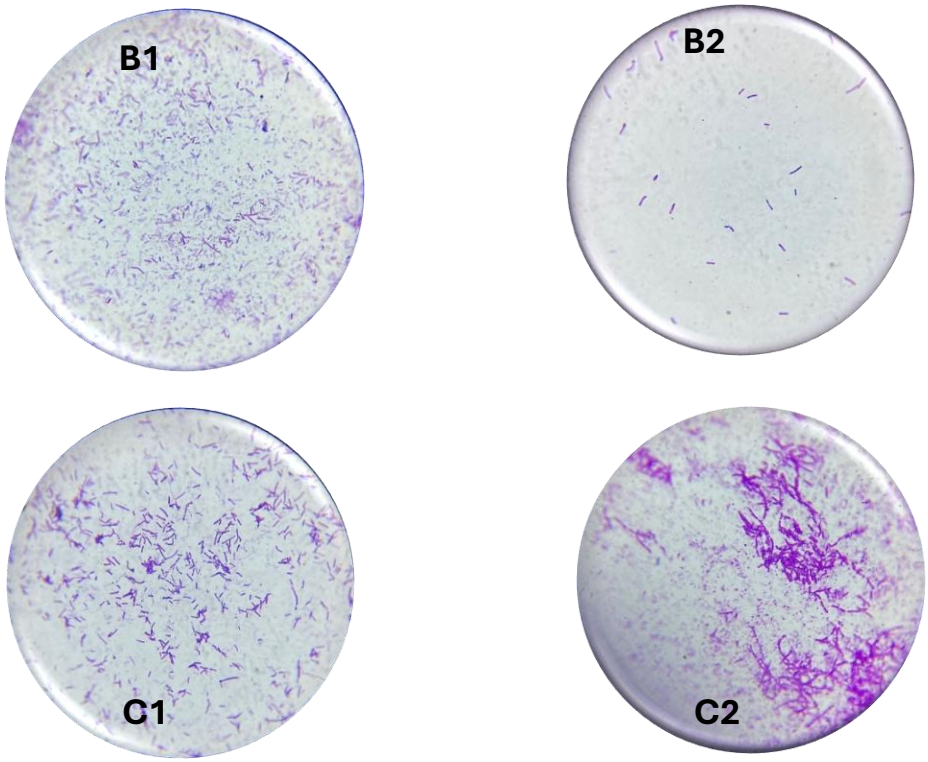


Figure 17 : Morphologie microscopique des isolats après coloration de gram (G×100) **(Photo personnelle)**

III.4 Étude des paramètres de croissance

III.4.1 Influence de la température (T°)

Les profils de croissance des quatre isolats étudiés face au gradient thermique (30°C, 37°C, 45°C et 55°C) révèlent des comportements physiologiques distincts **(Tableau 4 et Figure 18).** L'examen des résultats met en évidence une nette thermophilie chez la souche B1, dont le développement est totalement absent aux températures de 30°C et 37°C, mais s'avère optimal à 45°C et 55°C. L'isolat C1 affiche également un caractère thermophile, se développant à 30°C, 45°C et 55°C, malgré l'absence de croissance notée à la température intermédiaire de 37°C. À l'inverse, les souches B2 et C2 présentent un profil de type mésophile à thermotolérant. Leur prolifération est active sur la plage allant de 30°C à 45°C, tandis qu'une absence totale de leur croissance est enregistrée à la température maximale de 55°C.

Tableau 4 : Profil de croissance des isolats (B1, B2, C1, C2) soumis à différentes températures d'incubation.

Température (T°)	B1	B2	C1	C2
30°C	-	+	+	+
37°C	-	+	-	+
45°C	+	+	+	+
55°C	+	-	+	-

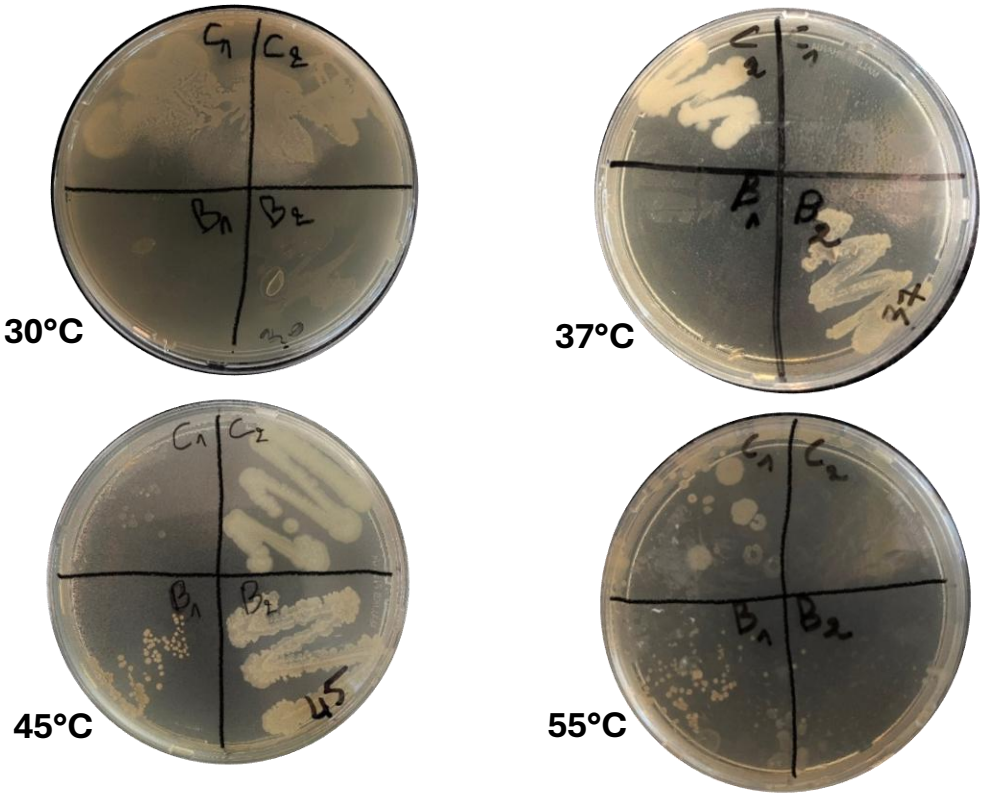


Figure 18 : Effet de différentes températures (30°C,37°C,45°C,55°C) sur développement des souches bactériennes **(Photo personnelle).**

Ces variations physiologiques reflètent directement l'état d'adaptation de la microflore autochtone vis-à-vis des conditions thermiques de leurs niches d'origine. La capacité des isolats B1 et C1 à proliférer à 55°C témoigne d'une thermostabilité remarquable de leurs systèmes enzymatiques et d'une adaptation structurelle de leurs membranes

cellulaires, typiques des bactéries thermophiles. En revanche, l'absence de croissance chez B2 et C2 à cette température limite supérieure s'explique par la dénaturation thermique de leurs protéines vitales, situant leur seuil maximal de tolérance à 45°C.

III.4.2 Influence de la salinité (NaCl)

L'évaluation de la tolérance au NaCl (1,5%, 4% et 9%) montre une forte sensibilité chez la majorité des souches **(Tableau 5 et Figure 19)**. Les isolats B1, C1 et C2 sont totalement inhibés dès la concentration de 1,5%. Seule la souche B2 présente une halotolérance modérée, avec une croissance nette à 1,5% et 4%, avant d'être bloquée à 9% NaCl.

Tableau 5 : Comportement des isolats (B1, B2, C1, C2) vis-à-vis du stress salin après incubation.

Salinité (NaCl)	B1	B2	C1	C2
1.5%	-	+	-	-
4%	-	+	-	-
9%	-	-	-	-

Ces résultats confirment le caractère non-halophile de la plupart des souches, ce qui s'explique par la faible salinité de leur source thermale d'origine. L'inhibition de B1, C1 et C2 montre leur fragilité face au stress osmotique. À l'inverse, la croissance de B2 jusqu'à 4% NaCl témoigne d'une bonne adaptation physiologique, probablement due à des mécanismes d'osmorégulation comme l'accumulation de solutés compatibles.

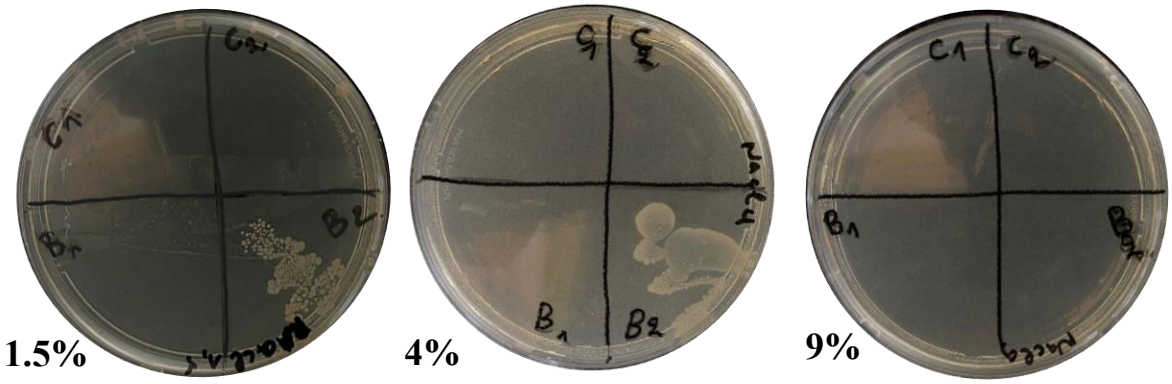


Figure 19 : Effet du stress salin (NACL) sur la croissance des quatre isolats (B1, B2, C1, C2) **(Photo personnelle)**

III.4.3 Influence du potentiel Hydrogène (pH)

L'évaluation de l'effet du potentiel hydrogène montre que l'isolat B1 se développe exclusivement à un pH acide (pH = 4), tandis que sa croissance est totalement inhibée aux valeurs neutre et alcaline (pH = 7 et 9). À l'inverse, l'isolat B2 s'avère capable de croître de manière vigoureuse à des valeurs de pH neutre et alcalin (pH = 7 et 9), mais reste totalement inhibé en milieu acide (pH = 4). Quant aux deux souches C1 et C2, aucune croissance n'a été enregistrée sur l'ensemble de la gamme testée **(Tableau 6, Figure 20).**

Tableau 6 : Effet des variations du pH sur l'aptitude de croissance des quatre isolats (B1, B2, C1, C2).

Potentiel Hydrogène (ph)	**B1**	**B2**	**C1**	**C2**
4	+	-	-	-
7	-	+	-	-
9	-	+	-	-

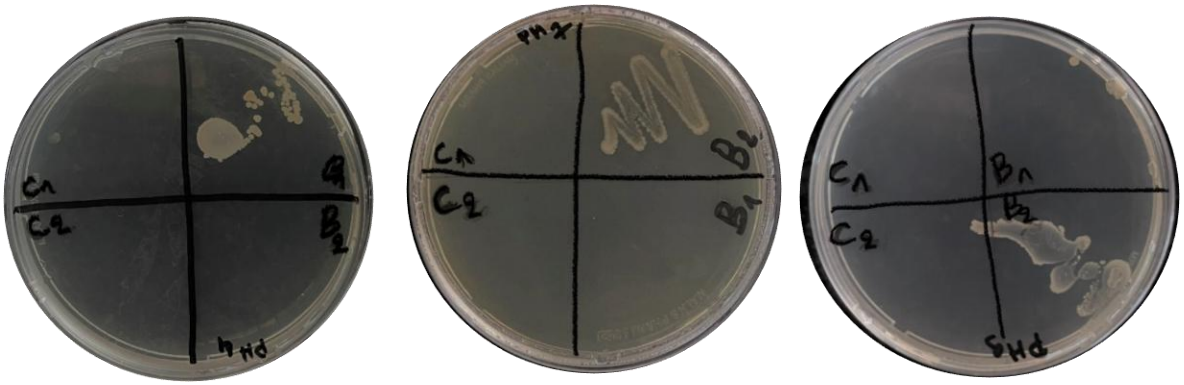


Figure 20 : Profil de croissance des souches bactériennes (B1, B2, C1, C2) à différentes valeurs de pH **(Photo personnelle).**

Notre milieu d'isolement constitue ainsi un réservoir de bactéries acidophiles strictes (souche B1) ou neutro-alcalotolérantes (souche B2) potentiellement utilisables en biotechnologie. De plus, la croissance sélective observée chez ces isolats suggère que ces bactéries ont développé des mécanismes physiologiques et membranaires d'adaptation spécifiques à ces conditions environnementales variées.

III.5 Recherches des enzymes respiratoires

III.5.1 Catalase

Les isolats B2 et C2 se sont révélés catalase (+), ce qui indique leur capacité à décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène (O_2), une réaction visualisée par l'apparition de bulles d'air. À l'inverse, les souches B1 et C1 ont montré un résultat (-), traduisant une absence complète d'effervescence **(Tableau 7, Figure 21).**

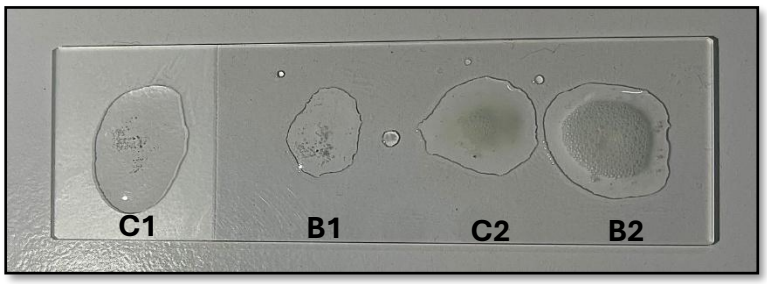


Figure 21 : Résultat du test de catalase sur lame pour les quatre souches **(Photo personnelle).**

III.5.2 Oxydase

Les isolats B_1, B_2 et C_1 se sont révélés oxydase (+), ce qui indique la présence d'une enzyme cytochrome c oxydase fonctionnelle au sein de leur chaîne respiratoire, une réaction visualisée par le virement rapide des disques à la couleur bleu-violet. À l'inverse, la souche C_2 a montré un résultat négatif (-), traduisant une absence de cette enzyme **(Tableau 7, Figure 22)**.

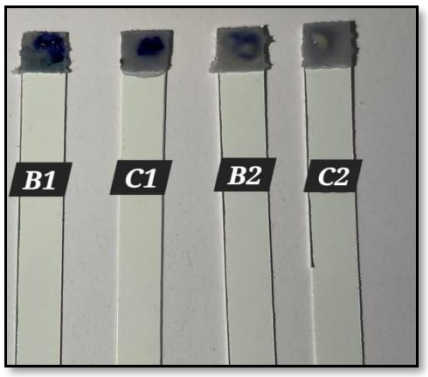


Figure 22 : Résultat du test oxydase pour les quatre souches **(Photo personnelle)**

La présence de cette activité enzymatique chez la majorité de nos isolats (B1, B2, C1) confirme leur capacité à utiliser l'oxygène comme accepteur final d'électrons au cours de la respiration aérobie. Ce caractère phénotypique permet de mieux orienter l'identification de ces souches au sein des grands groupes bactériens aérobies ou facultatifs.

III.5.3 Test ONPG

L'évaluation de l'activité β-galactosidase chez les quatre isolats microbiens a révélé une absence totale de ce système enzymatique. Après la période d'incubation, le milieu de culture est resté incolore et limpide pour l'ensemble des souches étudiées (B1, B2, C1 et C2), confirmant ainsi le caractère ONPG (-) de ces bactéries.

Ce profil négatif démontre l'incapacité de nos isolats à synthétiser la β-galactosidase, l'enzyme requise pour l'hydrolyse de l'ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) en galactose et ortho-nitrophénol **(Tableau 7)**. Par conséquent, ces souches ne peuvent pas utiliser le lactose par cette voie métabolique spécifique.

Tableau 7 : Profil enzymatique (catalase, oxydase et ONPG) des isolats bactériens étudiés

Isolats	Catalase	Oxydase	ONPG
B1	-	+	-
B2	+	+	-
C1	-	+	-
C2	+	-	-

III.6 Etude des caractères biochimiques

III.6.1 Test à l'indole

Les analyses effectuées **(Tableau 8, Figure 23)** révèlent que l'ensemble des souches bactériennes isolées présentent un caractère indole négatif. En effet, après l'ajout du réactif de Kovacs, aucune coloration rouge n'a été observée à la surface des tubes. Par conséquent, nos isolats s'avèrent incapables de synthétiser l'indole par dégradation du tryptophane. Ce profil biochimique est fréquemment observé et documenté chez les micro-organismes thermophiles **(Nazina *et al*., 2001).**

Tableau 8 : Résultats du test de l'indole pour les isolats B1, B2, C1, C2.

Isolat	**Observation (Réactif de Kovacs)**	**Résultat**	**Interprétation**
B1, B2, C1, C2	Absence d'anneau rouge	Négatif (-)	Absence de tryptophanase

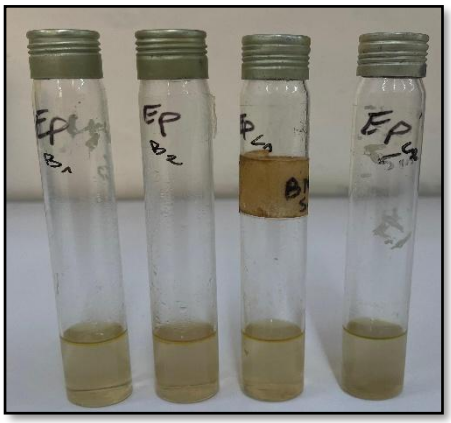


Figure 23 : Résultat Négatif du test à l'indole pour les isolats étudiés **(Photo personnelle).**

III.6.2 Test de Mannitol-Mobilité

Les résultats obtenus sur milieu semi-solide **(Tableau 9, figure 24)** révèlent des profils variables selon les isolats étudiés.

Pour la mobilité, les souches B1, B2 et C1 se révèlent immobiles (-), leur croissance étant strictement limitée à la ligne de piqûre. En revanche, l'isolat C2 présente une culture diffuse dans tout le tube, confirmant son caractère mobile (+).

Concernant la fermentation du mannitol, les souches B1, B2 et C2 affichent un résultat négatif (-) en maintenant la couleur rouge du milieu. Seul l'isolat C1 est positif (+), marqué par un virage jaune. Cette acidification modérée est caractéristique d'une production d'acide discrète face au pouvoir tampon élevé du milieu **(Joffin et Leyral, 2006)**.

Tableau 9 : Résultats du test Mannitol-Mobilité pour les isolats B1, B2, C1, C2.

Isolat	**Couleur du milieu**	**Caractère Mannitol**	**Aspect de la croissance**	**Caractère Mobilité**
B1	Rouge	Négatif (-)	Localisée sur la piqûre	Immobile (-)
B2	Rouge	Négatif (-)	Localisée sur la piqûre	Immobile (-)
C1	**Jaune**	**Positif (+)**	Localisée sur la piqûre	Immobile (-)
C2	Rouge	Négatif (-)	**Diffuse dans le tube**	**Mobile (+)**

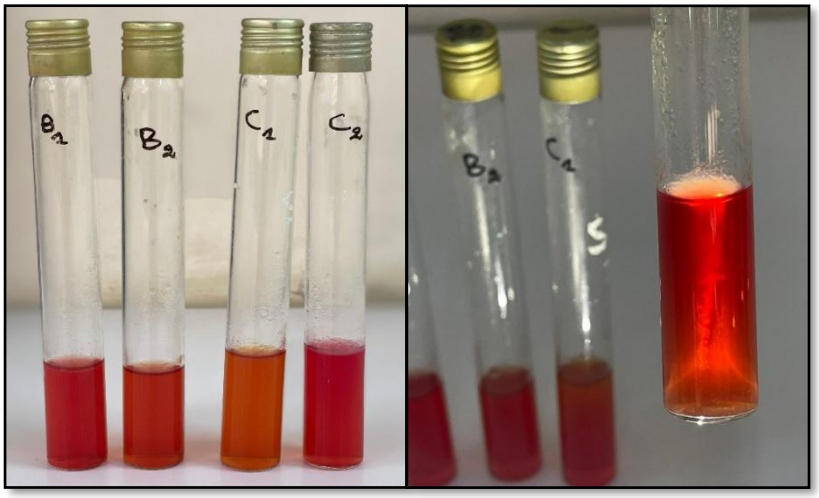


Figure 24 : Résultats du test Mannitol-Mobilité **(Photo personnelle).**

III.6.3 Test citrate de Simmons

Les données expérimentales relatives à l'utilisation du citrate comme seule source de carbone par nos isolats (B1, B2, C1 et C2) sont résumées dans **le Tableau 10** et illustrées dans **la Figure 25.**

L'examen macroscopique montre une persistance de la couleur verte initiale et une absence totale de croissance bactérienne pour toutes les souches, confirmant un caractère citrate (-). Ce résultat globalement négatif indique l'absence de la citrate-perméase, une enzyme clé de transport membranaire. Cette incapacité métabolique est un trait phénotypique classique chez de nombreux bacilles thermophiles isolés d'écosystèmes hydrothermaux **(De Vos *et al*., 2009).**

Tableau 10 : Aptitude des isolats thermophiles à l'utilisation du citrate.

Isolats	**Coloration du milieu**	**Développement bactérien**	**Résultat du test**
B1, B2, C1, C2	Persistance du vert	Aucun	Négatif (-)



Figure 25 : Résultats négatifs de l'utilisation du citrate sur milieu de Simmons **(Photo personnelle).**

III.6.4 Test de TSI

L'évaluation du profil fermentaire et respiratoire de nos quatre isolats thermophiles (B1, B2, C1 et C2) sur milieu TSI **(Tableau 11)** a révélé une absence totale de virage de l'indicateur coloré, le milieu ayant conservé son aspect initial. Ce résultat démontre un caractère non fermentaire vis-à-vis du glucose, du lactose et du saccharose, traduisant un métabolisme énergétique préférentiellement oxydatif fréquemment observé chez les bacilles issus de biotopes thermaux **(De Vos *et al*., 2009).**

De plus, aucune production gazeuse (Gaz $^{-}$) ni d'hydrogène sulfuré (H_2S^{-}) n'a été détectée, ce qui confirme l'absence des voies de réduction du thiosulfate chez ces souches viables **(MacFaddin, 2000)**. Enfin, contrairement aux autres isolats, la souche C1 n'a manifesté aucun développement, témoignant d'une sensibilité accrue aux composants sélectifs ou de besoins nutritionnels stricts sur ce milieu.

Tableau 11 : Evaluation du profil fermentaire et respiratoire des quatre souches (B1, B2, C1, C2) sur milieu TSI.

Isolats	**Fermentation des sucres (couleur)**	**Production de gaz**	**Production d'H_2S**	**Croissance**
B1	Pas de virage	Négatif (-)	Négatif (-)	**Présente**
B2	Pas de virage	Négatif (-)	Négatif (-)	**Présente**
C1	Pas de virage	Négatif (-)	Négatif (-)	Absente
C2	Pas de virage	Négatif (-)	Négatif (-)	**Présente**



Figure 26 : Résultats de la croissance et des différentes réactions biochimiques sur milieu TSI **(Photo personnelle).**

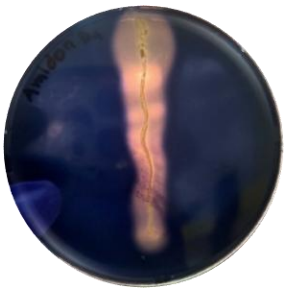
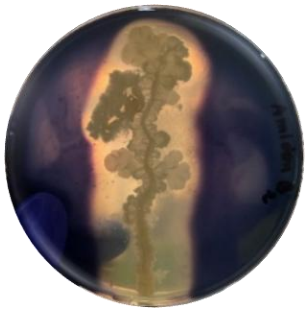
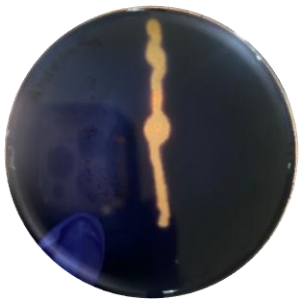
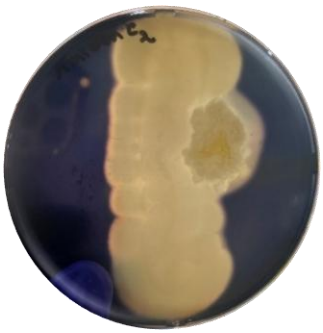
III.7 Mise en évidence des activités enzymatiques extracellulaires

III.7.1 Recherche de l'activité amylolytique

Les résultats du criblage de l'activité amylolytique de nos isolats sont regroupés dans le **Tableau 12**. L'observation macroscopique révèle une hétérogénéité entre les souches : B1, B2 et C2 présentent une activité (+) caractérisée par un halo transparent net après révélation au Lugol, tandis que l'isolat C1 s'est révélé (-).

La prédominance de cette production d'amylase extracellulaire chez nos isolats corrobore les conclusions de **Hassad et Immoune (2019)** à Hammam Righa, ainsi que celles de **Aissat et Mekki (2019)** à Hammam Guergour, ayant rapporté un important potentiel amylolytique chez des bacilles thermophiles. Cette propriété reflète une adaptation fonctionnelle de ces bactéries pour hydrolyser les substrats carbonés complexes au sein des sources thermales.

Tableau 12 : Evaluation de l'activité amylolytique et mise en évidence de l'hydrolyse de l'amidon par les isolats bactériens**.**

Isolats	Résultats	Amylase
B1	**Positif (+)**	
B2	**Positif (+)**	
C1	Négatif (-)	
C2	**Positif (+)**	

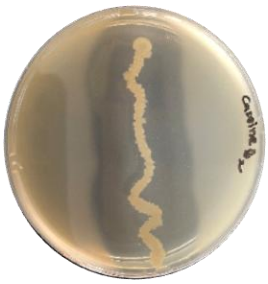
III.7.2 Activités protéolytiques (Protéases)

III.7.2.1 Hydrolyse de la Caséine

Les résultats de l'activité caséinasique de nos isolats sont regroupés dans le **Tableau 13**. L'observation des boîtes de gélose au lait écrémé montre que les souches B2, C1 et C2 possèdent une activité protéolytique positive (+), matérialisée par un halo transparent autour de la croissance bactérienne. En revanche, l'isolat B1 s'est révélé négatif (-).

Cette capacité à dégrader la caséine concorde avec les données de **Hassad et Immoune (2019)** à Hammam Righa, et celles de **Aissat et Mekki (2019)** à Hammam Guergour, qui ont mis en évidence une prédominance de l'activité protéasique chez les bacilles thermophiles. La sécrétion de ces protéases extracellulaires représente une adaptation majeure de ces bactéries pour exploiter les sources d'azote complexes dans les écosystèmes thermaux.

Tableau 13 : Evaluation de l'activité caséinasique des quatre isolats bactériens étudiés

Isolats	Résultat	Caséinase
B1	Négatif (-)	
B2	**Positif (+)**	
C1	**Positif (+)**	
C2	**Positif (+)**	

III.7.2.2 Hydrolyse de la Gélatine

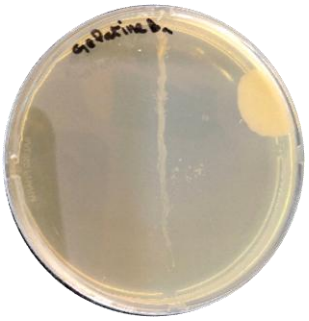
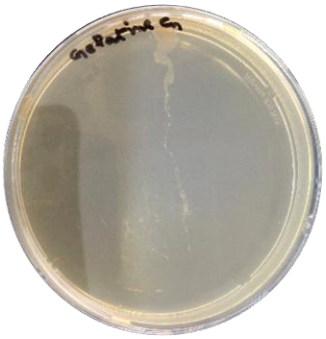
Les résultats de la recherche de l'activité gélatinolytique de nos isolats sont regroupés dans le Tableau 16. L'observation macroscopique montre une absence totale de halo de clarification autour des colonies, confirmant un caractère gélatinase négatif (-) pour toutes les souches (B1, B2, C1 et C2).

Ce résultat indique que nos isolats ne sécrètent pas de gélatinase extracellulaire.

Contrairement aux observations de **Hassad et Immoune (2019)** à Hammam Righa, et de **Aissat et Mekki (2019)** à Hammam Guergour, qui décrivent souvent une forte activité protéolytique chez les bacilles thermophiles, nos souches présentent une spécificité

enzymatique différente, orientée préférentiellement vers la dégradation de l'amidon et de la caséine.

Tableau 14 : Mise en évidence de l'activité gélatinasique des isolats étudiés.

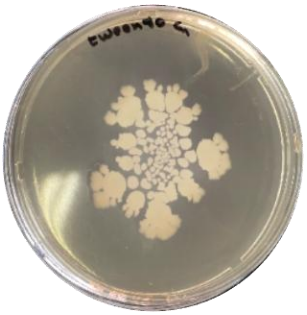
Isolats	Résultat	Gélatinase
B1	Négatif (-)	
B2	Négatif (-)	
C1	Négatif (-)	
C2	Négatif (-)	

III.7.3 Activités lipolytiques (Lipases – Tween 80)

L'évaluation du potentiel lipasique de nos souches a donné les résultats consignés dans **le Tableau 15**. L'analyse visuelle des milieux de culture ne montre aucun signe de précipitation ou d'opacification saline, traduisant une absence totale d'hydrolyse du Tween 80 pour l'ensemble des isolats (B1, B2, C1 et C2).

Ce profil uniformément négatif démontre l'absence de sécrétion d'estérases ou de lipases extracellulaires chez ces bactéries. Bien que la littérature scientifique sur les sources thermales algériennes mette souvent en avant la diversité des hydrolases disponibles dans ces biotopes, nos résultats révèlent une spécialisation métabolique stricte de nos souches.

Tableau 15 : Evaluation de l'activité lipolytique des isolats B1, B2, C1etC2 sur milieu tween 80.

Isolats	Résultat	Lipase/estérase
B1	Négatif (-)	
B2	Négatif (-)	
C1	Négatif (-)	
C2	Négatif (-)	

III.8 Évaluation de l'activité antimicrobienne

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne sont regroupés dans le tableau ci-dessous

Tableau 16 : Evaluation de l'activité des bactéries à gram positif des quatre isolats bactériens (B1, B2, C1, C2) et mesure des zones d'inhibition

Microorganismes	**Diamètre de la zone d'inhibition (mm)**		**Photos des boites pétri**
Bactérie à gram positif			
Bacillus cereus ***(Bc)***	B1	-	
	B2	-	
	C1	-	
	C2	-	
Bacillus subtilis ***(Bs)***	B1	-	
	B2	-	
	C1	-	
	C2	-	
Enterococcus faecalis ***(Ef)***	B1	8mm	
	B2	-	
	C1	-	
	C2	-	
Staphylococcus aureus ***(Sa)***	B1	-	
	B2	-	
	C1	-	
	C2	-	
Micrococcus luteus ***(Ml)***	B1	-	
	B2	20mm	
	C1	-	
	C2	10mm	

Tableau 17 : Evaluation de l'activité des bactéries à gram négatif des quatre isolats bactériens (B1, B2, C1, C2) et mesure des zones d'inhibition

Microorganisme	**Diamètre de la zone d'inhibition (mm)**		**Photos des boites pétri**
Bactérie à gram négatif			
Escherichia coli ***(Ec)***	B1	-	
	B2	-	
	C1	-	
	C2	-	
Klebsiella pneumoniae ***(Kp)***	B1	8 mm	
	B2	10 mm	
	C1	-	
	C2	-	
Pseudomonas aeruginosa ***(Pa)***	B1	8 mm	
	B2	9 mm	
	C1	7 mm	
	C2	-	

Tableau 18 : Evaluation de l'activité antifongique des quatre isolats bactériens (B1, B2, C1, C2) et mesure des zones d'inhibition

Microorganisme	**Diamètre de la zone d'inhibition (mm)**		**Photos des boites pétri**
Levure			
Candida albicans ***(Ca)***	B1	-	
	B2	-	
	C1	-	
	C2	8mm	

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des quatre isolats (B1, B2, C1, C2) révèle une variabilité marquée de l'action inhibitrice selon la souche cible testée.

Vis-à-vis des bactéries à Gram positif, les profils d'inhibition diffèrent notablement. Pour *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*, une résistance totale a été enregistrée, n'affichant aucune zone d'inhibition face aux quatre isolats. Concernant *Enterococcus faecalis*, seule une sensibilité discrète a été observée face à l'isolat B1 (8mm), tandis que les autres isolats sont restés inactifs. De même, la souche *Staphylococcus aureus* a manifesté une résistance absolue à l'ensemble des produits testés. En revanche, *Micrococcus luteus* s'est révélée être la souche la plus sensible de ce groupe, montrant une zone d'inhibition majeure de 20mm avec l'isolat B2, suivi par C2 (10mm) et B1 (8mm).

Pour ce qui est des bactéries à Gram négatif, les réponses cellulaires s'avèrent également sélectives. La souche *Escherichia coli* a montré une résistance complète, ne réagissant à aucun des isolats. À l'inverse, *Klebsiella pneumoniae* s'est révélée sensible uniquement aux isolats de type B, avec une zone de 10mm pour B2 et de 8mm pour B1. Quant à *Pseudomonas aeruginosa*, elle a été freinée simultanément par trois isolats, affichant des zones de 9mm avec B2, 8mm avec B1 et 7mm avec C1. Enfin, concernant les champignons, l'évaluation de l'action antifongique contre la levure *Candida albicans* a mis en évidence une efficacité exclusive de l'isolat C2, qui a généré une zone d'inhibition de 8mm.

La confrontation de ces données indique que la lignée B, menée par l'isolat B2, déploie un potentiel inhibiteur étendu, capable de restreindre la croissance de cibles

bactériennes aux profils membranaires pourtant opposés. Cette large réactivité laisse présumer une sécrétion de substances antibactériennes diffuses à forte efficacité, à l'image de structures bactériocines ou de monomères peptidiques endommageant la stabilité de l'enveloppe des germes cibles. À l'inverse, une logique métabolique distincte caractérise l'isolat C2. Son action ciblant préférentiellement la levure *Candida albicans* met en évidence une synthèse de principes biocides originaux. Ce comportement découle vraisemblablement de la sécrétion d'agents antifongiques spécialisés ou de complexes enzymatiques capables de déstabiliser le réseau rigide glucidique propre aux parois des micro-organismes eucaryotes.

Par ailleurs, l'absence d'inhibition constatée chez des taxons comme *B. cereus, B. subtilis, S. aureus et E. coli* s'explique par le déploiement de stratégies de protection cellulaire hautement spécifiques. Chez l'espèce à Gram négatif. *E. coli*, l'agencement de son feuillet membranaire externe, fortifié par des complexes lipopolysaccharidiques denses, bloque physiquement le passage des molécules thérapeutiques issues des isolats. Pour les souches à Gram positif insensibles, ce phénomène de survie s'appuie plutôt sur une régulation fine des récepteurs de surface, l'expulsion des composés toxiques via des transporteurs d'efflux, ou encore la neutralisation des métabolites par des voies enzymatiques de dégradation. En somme, les isolats B2 et C2 s'affirment comme des sources biologiques à forte valeur ajoutée, ouvrant la voie à des étapes ultérieures d'isolement pour caractériser la structure exacte de ces molécules actives.

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la caractérisation microbiologique de deux sources thermales de l'ouest algérien, à savoir Hammam Chiguer et Hammam Boughrara. Ce milieu extrême, encore peu exploré sur le plan biotechnologique, s'est révélé propice à la recherche de bactéries thermophiles dotées de potentialités enzymatiques et antimicrobiennes d'intérêt industriel.

L'analyse des échantillons d'eau prélevés a permis d'isoler et de purifier quatre souches bactériennes distinctes, réparties équitablement entre les deux sites d'étude (deux souches issues de Hammam Boughrara et deux de Hammam Chiguer). L'observation microscopique après coloration a révélé que la totalité de nos isolats sont des bacilles à Gram positif. Sur le plan morphologique, une diversité inter-souches a été constatée concernant l'aspect des colonies : les souches B1, B2 et C1 ont présenté un aspect opaque, tandis que la souche C2 a manifesté un caractère translucide.

L'exploration des paramètres physiologiques de croissance (température, pH et tolérance au NaCl) ainsi que l'étude des caractères biochimiques classiques (tests indole, mannitol, TSI et citrate de Simmons) et la recherche des enzymes respiratoires (catalase, oxydase et test ONPG) ont permis d'adresser un profil phénotypique préliminaire de ces isolats thermophiles.

Sur le plan fonctionnel, l'évaluation du potentiel hydrolytique a mis en évidence des aptitudes enzymatiques hautement intéressantes. En effet, l'activité amylasique, caractérisée par l'hydrolyse de l'amidon, a été clairement exprimée par les souches B1, B2 et C2, tandis que l'activité caséinasique liée à l'hydrolyse de la caséine a été manifestée par les isolats B2, C1 et C2. Toutefois, il convient de noter qu'aucune des quatre souches n'a montré de capacité à hydrolyser la gélatine ou les lipides dans nos conditions expérimentales.

Ces aptitudes hydrolytiques combinées confèrent à nos isolats thermophiles, particulièrement les souches B2 et C2, un grand intérêt biotechnologique. En effet, la capacité de produire des enzymes actives à des températures élevées ouvre des perspectives prometteuses pour leur application dans divers secteurs industriels, tels que les industries agroalimentaires, la formulation de détergents biodégradables, ou encore dans les procédés de traitement et de valorisation des déchets organiques.

Par ailleurs, l'étude du potentiel antimicrobien de nos isolats vis-à-vis de souches de référence (Gram positif, Gram négatif et champignons) a été faite en utilisant la méthode des disques d'agar (Agar-discs method).

Les résultats majeurs de cette évaluation révèlent que l'isolat B2 se distingue par un spectre d'antagonisme étendu, capable de restreindre efficacement la croissance de souches indicatrices clés à Gram positif (*Micrococcus luteus*) et à Gram négatif *(Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*). Parallèlement, l'isolat C2 a manifesté une spécificité fonctionnelle remarquable en s'affirmant comme l'unique agent doté d'un pouvoir inhibiteur ciblé contre la levure pathogène *Candida albicans*. À l'inverse, la résistance constatée chez certains taxons, notamment *Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus*, témoigne de la performance de leurs barrières structurelles ou de leurs mécanismes d'efflux intrinsèques.

En conclusion, ces résultats préliminaires confirment que les écosystèmes thermaux de l'ouest algérien recèlent une microflore thermophile active. Ces souches, en particulier celles combinant plusieurs activités hydrolytiques, constituent une base solide pour de futures applications biotechnologiques.

En guise de perspectives, afin d'ouvrir de nouvelles voies à ce travail et de valoriser au mieux le potentiel des isolats obtenus, il serait intéressant de :

- Réaliser le séquençage du gène de l'ARNr 16S pour identifier précisément le genre et l'espèce de nos quatre souches.
- Rechercher par PCR les gènes responsables de la production des enzymes hydrolytiques, en particulier les amylases.
- Produire et purifier les amylases et les caséinases afin d'étudier leur stabilité face à la chaleur et aux pH alcalins.
- Déterminer les concentrations minimales d'inhibition (CMI) de nos extraits contre des bactéries pathogènes multi-résistantes.
- Étudier la croissance de ces souches en bioréacteur pour optimiser et augmenter le rendement de production de ces biomolécules.

Références Bibliographique

- **Aissat, I., & Mekki, N.** (2019). Isolement et caractérisation de bactéries de la source naturelle de Hammam Guergour (Nord de Sétif-Algérie) (Mémoire de master). *Université Mohamed Boudiaf de M'Sila.*
- **Arlet, G., & Champs, C.** (2009). Bactériologie*. Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale, pp. 4-6.*
- **Benammar, L., İnan Bektaş, K., Menasria, T., Beldüz, A. O., Güler, H. I., Bedaida, I. K., Gonzalez, J. M., & Ayachi, A.** (2020). Diversity and enzymatic potential of thermophilic bacteria associated with terrestrial hot springs in Algeria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(4), 1987-2007. https://doi.org/10.1007/s42770-020-00376-0
- **Benkahoul, M., Talhi, A., & Boulefkhad, N.** (2017). Bactéries des environnements chauds Algériens : isolement et mise en évidence de la production d'hydrolases. *Sciences & Technologie C - Université Frères Mentouri Constantine 1, (45), 25-35.*
- **Bennahia, A.** (2020). Caractérisation physico-chimique des eaux thermales de la région de Maghnia (Hammam Boughrara et Hammam Chiguer) (Mémoire de Master). *Université Djillali Liabès de Sidi Bel Abbès.*
- **Benzerfa, D., Chenina, N., & Cherouine, N.** (2021). Isolement et identification des bactéries thermophiles à partir de la station thermale de Hammam Sidi Aissa, wilaya de Saïda (Mémoire de master, Microbiologie appliquée). *Université Ibn Khaldoun, Tiaret, 72 p.*
- **Boudraa, W., Bengati, S., & Djamaa, F.** (2011). Contribution à l'étude de la qualité bactériologique et physico-chimique de l'eau de la ville d'Annaba (Mémoire de master en microbiologie de l'environnement). *Université de Guelma, pp. 47, 50.*
- **Bramki, A.** (2019). Isolement et identification de souches d'Aspergillus de différents écosystèmes productrices de substances à activité antibactérienne et caractérisation partielle des molécules élaborées (Thèse de Doctorat 3ème Cycle : Biochimie Appliquée). *Université des Frères Mentouri-Constantine 1, 173 p.*
- **Cavallo, J. D., & Eberlin, J.** (1994). Contrôle de qualité en microbiologie : Standardisation de l'inoculum et des techniques de diffusion. *Paris, France : Éditions de la Société Française de Microbiologie (SFM).*
- **Centre de Développement des Énergies Renouvelables (CDER).** (2008). Les sources thermales en Algérie : inventaire et caractéristiques physico-chimiques. *CDER, Alger.*

- **Chorfi, A., Bensoltane, A., & Hamdi, H.** (2019). Les caractéristiques des eaux thermales en Algérie : entre richesse naturelle et valorisation thérapeutique. *Revue des Sciences de l'Eau et de l'Environnement,* 34(2), 145–158.
- **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).**(2020).Performance standard for antimicrobial susceptibility testing (30th ed., CLSI supplement M100). *Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.*
- **Cypress Diagnostics.** (2023). Instruction for use: Cytochrome Oxidase Test Strips. *Langdorp, Belgium.*
- **De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., & Whitman, W. B. (Eds.).** (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (2e éd.). *Springer-Verlag.*
- **Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., & Krieg, N. R. (Eds.).** (1994). Methods for General and Molecular Bacteriology. *American Society for Microbiology.*
- **Gherna, R. L.** (1981). Preservation. In P. Gerhardt (Ed.), Manual of Methods for General Bacteriology (pp. 208-217). *American Society for Microbiology.*
- **Goldman, E., & Green, L. H. (Eds.).** (2015). Practical Handbook of Microbiology (3rd ed.). *CRC Press.*
- **Guiraud, J. P.** (2012). Microbiologie alimentaire. *Dunod.*
- **Guta, M., Abebe, G., Bacha, K., & Cools, P.** (2024). Screening and characterization of thermostable enzyme-producing bacteria from selected hot springs of Ethiopia. *Microbiology Spectrum, 12(3), e03710-23*. https://doi.org/10.1128/spectrum.03710-23
- **Haki, G. D., & Rakshit, S. K.** (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes. *Bioresource Technology*, 89, 17-34.
- **Harley, J. P., & Prescott, L. M.** (2002). Laboratory Exercises in Microbiology (5th ed.). *McGraw-Hill, 449 p.*
- **Hassad, C., & Immoune, R.** (2019). Caractérisation de bactéries thermophiles : criblage d'activités enzymatiques (Thèse de doctorat). *Université Mouloud Mammeri.*
- **Issaadi, A.** (1992). Le thermalisme dans son cadre géo-structural, apports à la connaissance de la structure profonde de l'Algérie et de ses ressources géothermales (Thèse de doctorat d'État). *IST USTHB, Alger.*

- **JORA.** (2007). Titre de l'étude ou du rapport sur les eaux thermales. *Journal Officiel de la République Algérienne (Rapport).*
- **Joffin, J. N., & Leyral, G.** (2006). Microbiologie Technique Tome 1 : Dictionnaire des techniques. *CRDP AQUITAINE, Bordeaux, pp. 189-250.*
- **Krulwich, T. A., Sachs, G., & Padan, E.** (2011). Molecular aspects of bacterial pH homeostasis. *Nature Reviews Microbiology, 9(5), 330–343*. https://doi.org/10.1038/nrmicro2549
- **Larbi Daouadji, K.** (2015). Isolement et caractérisation des souches productrices de lipase (Thèse de doctorat, Microbiologie moléculaire et protéomics). *Université Djillali Liabes, Sidi Bel Abbes, Algérie, 165 p.*
- **Le Petit Robert.** (1994). Le Petit Robert de la langue française (3e éd.). *Dictionnaires Le Robert.*
- **Lederberg, J.** (1950). The beta-D-galactosidase of Escherichia coli, strain K-12. *Journal of Bacteriology*, 60(4), 381-392.
- **MacFaddin, J. F.** (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria (3rd ed.). *Lippincott Williams & Wilkins*.
- **Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A.** (2020). Brock Biology of Microorganisms (16th ed.). *Pearson.*
- **Meghroudi, S.** (2022). Étude de la diversité microbienne des environnements thermaux de la région de Tlemcen (Mémoire de Master). *Université de Tlemcen*.
- **Meziani, M.** (2012). Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et Pseudomonas (Mémoire de Magister). *Université Mentouri, Constantine, pp. 30, 32.*
- **Mora, D., & Arioli, S.** (2014). Microbial culture media. In Encyclopedia of Food Microbiology (pp. 513-520). *Elsevier.* https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00204-X
- **Nazina, T., Tourova, T., Poltaraus, A., Novikova, E., Grigoryan, A., & Ivanova, A.** (2001). Étude taxonomique des bacilles thermophiles aérobies : descriptions de Geobacillus subterraneus gen sp et Geobacillus uzenensis sp des réservoirs pétroliers et transfert de Bacillus stearothermophilus, Bacillus thermocatenulatus, Bacillus thermoleovorans, Bacillus kaustophilus, Bacillus thermdenitrificans à Geobacillus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *51(2), 433-446.*

- **Nguyen Ba, C.** (2020). Eau thermale : une eau minérale naturelle jaillissant à ≥25 °C, riche en minéraux et en oligo-éléments, non traitée. *EM-Consulte, supplément*, *147(1S), 1S20–1S24.*
- **Ouali, S.** (2008). Les sources thermales en Algérie. *Division Énergie Solaire Thermale et Géothermie*, 13, 16–18.
- **Padan, E., Bibi, E., Ito, M., & Krulwich, T. A.** (2005). Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1717(2), 67–88. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.010*
- **Pezzlo, M. T., Isenberg, H. D., & Garcia, L. S.** (1992). Manual of Clinical Microbiology. *American Society for Microbiology.*
- **Richard, C.** (1996). Collection option bio : Les eaux, les bactéries, les hommes et les animaux. *Elsevier, 115 p.*
- **Roques, C. F.** (2007). Géoscience et santé : Le thermalisme, la médecine que la terre nous a donnée. *112 p*.
- **Saidan, S. A., Jarboui, R., Alsharari, S. S., & Azab, M. S.** (2024). Characterization and Identification of Thermophilic Bacteria Isolated from Different Sites Located in Al-Jouf Region, Saudi Arabia. *Journal of Pure and Applied Microbiology, 18(1), 243-256*. https://doi.org/10.22207/JPAM.18.1.07
- **Sanders, E. R.** (2012). Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *Journal of Visualized Experiments, (63), e3064*. https://doi.org/10.3791/3064
- **Snell, J. J.** (1984). General introduction to maintenance methods. In Kress, L. A., Snell, J. J., & Lapage, S. P. (Eds.), Maintenance of Microorganisms (pp. 1-11). *Academic Press.*
- **Thomas, J., Dupont, M., & Martin, L.** (1970). Techniques de microbiologie : Identification macroscopique des cultures. *Éditions Médicales.*
- **Thomas, M., et al.** (1970). Méthodes de diagnostic en microbiologie.
- **Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L.** (2016). Microbiology: An Introduction (12th ed.). *Pearson.*
- **Traissac, M., Dupont, J., & Lafont, A.** (1999). Classification des eaux thermales en fonction de leur minéralisation. *Journal des Sciences de l'Eau et de l'Environnement, 12(3), 215–226.*
- **Wiley, J., Sandman, K., & Wood, D.** (2019). Prescott's Microbiology (11th ed.). *McGraw-Hill Education.*

ملخص
تُعدّ الينابيع الحموية أنظمة بيئية مميزة تؤوي تنوعًا واسعًا من الكائنات الحية الدقيقة المتكيفة مع درجات الحرارة المرتفعة. ومن بين هذه الكائنات، تحظى البكتيريا المحبة للحرارة باهتمام متزايد نظرًا لقدرتها على إنتاج إنزيمات ثابتة حراريًا تُستغل على نطاق واسع في العديد من المجالات الصناعية. هدفت هذه الدراسة إلى إجراء توصيف ميكروبيولوجي لمياه الينابيع الحموية لكل من حمام بوغرارة وحمام الشيغر (غرب الجزائر)، وذلك بهدف عزل بكتيريا متحملة للحرارة ذات إمكانات بيوتكنولوجية.
أظهرت قدرات مختلفة على التكيف مع درجة (C2و C1، B2، B1) أسفرت الدراسة عن عزل أربع سلالات من العصيات موجبة الغرام ، ونشاط إنزيم C2و B2 الحرارة ودرجة الحموضة والملوحة. وعلى المستوى البيوكيميائي، تم الكشف عن نشاط إنزيم الكاتالاز لدى السلالتين سلبية لدى جميع السلالات المعزولة. TSIوالإندول والسيترات و ONPG ، في حين كانت اختباراتC1و B2و B1 الأوكسيداز لدى السلالات نشاطًا محللًا للكازيين، في حين لم يُسجل أي C2و C1و B2 نشاطًا محللًا للنشا، بينما أظهرت السلالات C2و B2و B1 كما أظهرت السلالات نشاط للجيلاتيناز أو الليباز.وأظهر تقييم النشاط المضاد للميكروبات تأثيرات تثبيطية متفاوتة ضد عدد من الكائنات الممرضة، شملت Candidaو Pseudomonas aeruginosaو Klebsiella pneumoniaeو Micrococcus luteusو Enterococcus faecalis بقطر منطقة تثبيط بلغ 20 مم.تؤكد هذه النتائج التنوع الميكروبي M. luteus بأقوى نشاط تثبيطي ضد B2 وقد تميزت السلالة albicans. للمواقع المدروسة، كما تبرز الإمكانات البيوتكنولوجية الواعدة للسلالات المعزولة في إنتاج الإنزيمات خارج الخلوية والمركبات الحيوية ذات النشاط المضاد للميكروبات.
الكلمات المفتاحية: الينابيع الحموية، حمام بوغرارة، حمام الشيغر، البكتيريا المتحملة للحرارة، التوصيف الميكروبيولوجي، الأنشطة الإنزيمية، النشاط المضاد للميكروبات.

Abstract
Thermal springs constitute unique ecosystems harboring a wide diversity of microorganisms adapted to high temperatures. Among them, thermophilic bacteria have attracted increasing interest due to their ability to produce thermostable enzymes widely used in various industrial sectors. The objective of this study was to perform a microbiological characterization of the thermal waters of Hammam Boughrara and Hammam Chiguer springs (Western Algeria) in order to isolate thermotolerant bacteria with biotechnological potential.
The study led to the isolation of four Gram-positive bacilli strains (B1, B2, C1, and C2) exhibiting diverse adaptation capacities to temperature, pH, and salinity. Biochemical characterization revealed catalase activity in strains B2 and C2, and oxidase activity in strains B1, B2, and C1, whereas ONPG, indole, citrate, and TSI tests were negative for all isolates. Furthermore, amylolytic activity was observed in strains B1, B2, and C2, while caseinolytic activity was detected in B2, C1, and C2. No gelatinase or lipolytic activity was recorded.The evaluation of antimicrobial activity revealed variable inhibitory effects against several pathogenic microorganisms, including Enterococcus faecalis, Micrococcus luteus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, and Candida albicans. Among the isolates, strain B2 exhibited the strongest activity against M. luteus, with an inhibition zone of 20 mm.Overall, these findings highlight the microbial diversity of the investigated thermal springs and demonstrate the biotechnological potential of the isolated strains for the production of extracellular enzymes and antimicrobial bioactive compounds.
Keywords: Thermal springs, Hammam Boughrara, Hammam Chiguer, thermotolerant bacteria, microbiological characterization, enzymatic activities, antimicrobial activity.

Résumé
Les sources thermales constituent des écosystèmes particuliers abritant une diversité de microorganismes adaptés aux températures élevées. Parmi eux, les bactéries thermophiles suscitent un intérêt croissant en raison de leur capacité à produire des enzymes thermostables largement exploitées dans divers domaines industriels. L'objectif de cette étude porte sur la caractérisation microbiologique des eaux des sources thermales de Hammam Boughrara et Hammam Chiguer (Ouest algérien) afin d'isoler des bactéries thermotolérantes à potentiel biotechnologique.
Les travaux ont permis d'isoler quatre souches de bacilles à Gram positif (B1, B2, C1 et C2) présentant une diversité d'adaptation selon la température, le pH et la salinité. Sur le plan biochimique, l'activité catalase est détectée chez B2 et C2, et l'oxydase chez B1, B2 et C1, alors que les tests ONPG, indole, citrate et TSI sont restés négatifs. De plus, une activité amylolytique (B1, B2, C2) et caséinolytique (B2, C1, C2) a été observée, sans aucune activité gélatinase ni lipolytique. L'évaluation de l'activité antimicrobienne a révélé des effets inhibiteurs variables contre plusieurs pathogènes (Enterococcus faecalis, Micrococcus luteus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa et Candida albicans), où la souche B2 s'est distinguée par une action marquée contre M. luteus (zone de 20 mm). Dans l'ensemble, ces résultats soulignent la diversité microbiologique des sites et mettent en évidence l'intérêt biotechnologique des isolats pour la production d'enzymes extracellulaires et de composés bioactifs antimicrobiens.
Mots-clés : Sources thermales, Hammam Boughrara, Hammam Chiguer, bactéries thermotolérantes, caractérisation microbiologique, activités enzymatiques, activité antimicrobienne