



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

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement
مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية للأغذية البيوطي والبيئة



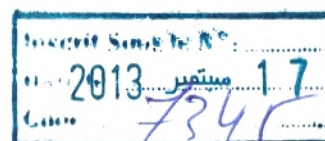
MEMOIRE DE MASTER

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE

Présenté par

YOUSFI AHMED



Thème

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA BIODIVERSITE DES *BACILLUS*
EXTRÊMOPHILES ISOLÉS DE LA SOURCE THERMALE DE
HAMMAM DEBAGH -GUELMA-
(Griffon D)

-CRIBLAGE D'ACTIVITÉS ANTIMICROBIENNES-

Soutenu le 27 /06 /2013

Devant le Jury composé de :

Présidente : Dr. HASSAINE Haféda Maitre de conférence de classe « A »

Promotrice : Dr. KHELIL Nihel Maitre de conférence de classe « A »

Examineur : M^r. GHELLAI Lotfi Maitre assistance charge de cours



Année Universitaire : 2012-2013



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



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

MEMOIRE DE MASTER

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE

Présenté par

YOUSFI AHMED

Thème

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA BIODIVERSITE DES *BACILLUS*
EXTRÊMOPHILES ISOLÉS DE LA SOURCE THERMALE DE
HAMMAM DEBAGH -GUELMA-
(Griffon D)**

-CRIBLAGE D'ACTIVITÉS ANTIMICROBIENNES-

Soutenu le 27 /06 /2013

Devant le Jury composé de :

Présidente : Dr. HASSAINE Hafeda Maitre de conférence de classe « A »

Examineur : M^r. GHELLAI Lotfi Maitre assistance charge de cours

Promotrice : Dr. KHELIL Nihel Maitre de conférence de classe « A »

Année Universitaire : 2012-2013

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je tiens à remercier « **Allah** » qui m'a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

Mes remerciements à Madame **Khelil Nihel** née **Klouche** Maître de conférence classe A à l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen pour m'avoir donné la chance de travailler sous sa direction, pour sa confiance en moi et ses encouragements.

Mes remerciements sont adressés aux membres du Jury qui ont pris sur leur temps et ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail :

Dr. HASSAINE Haféda qui m'a fait l'honneur de présider ce Jury

Mr. GHELLAI Lotfi qui a bien voulu examiner ce travail

Je tiens à remercier **Mlle Fatima et Nadia** pour leur aide dans ce travail.

Un grand merci à toutes les personnes que j'ai côtoyé au cours de la réalisation de cette étude : personnel et enseignants de **L.A.M.A.A.B.E.**

Que mes remerciements aillent aussi à mes amis pour l'amitié et la sympathie qu'ils m'ont témoigné ces années.

Enfin, Merci à **Ma famille....**et surtout à mon **père** et ma **mère**.

SOMMAIRE

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction général.....1

Synthèse bibliographique

1. Les Bactéries extrêmophiles.....4

1.1- Historique4

1.1.1- Environnements extrêmes et extrêmophiles.....4

1.1.2- Biodiversité exceptionnelle. Collections limitées6

1.1.3- Accessibilité inégale8

1.2- Propriétés des extrêmophiles.....8

1.3- Applications biotechnologiques.....9

2. Les bactéries thermophiles et hyperthermophiles.....11

2.1-Les Bactéries thermophiles.....11

2.2- Les Bactéries hyperthermophiles11

2.3-Les micro-organismes des sources hydrothermales12

2.4- La physiologie de hyperthermophiles.....	13
2.5-Écologie des hyperthermophiles des sources hydrothermales et des fonds marins.....	13
2.6- Culture de hyperthermophiles	16
2.6.1 Métabolisme hyperthermophile	16
2.6.2 Croissance des hyperthermophiles.....	17
2.7 - Applications industrielles et de technologie des hyperthermophiles ...	18
2.7.1- Application des hyperthermophiles des profonds en technologies de bioremédiation.....	19
3. Le genre <i>Bacillus</i>	20
3.1-Historique	20
3.2-Identification du genre <i>Bacillus</i>	20
3.3-Les <i>bacillus</i> dans la biotechnologie	24
4. Screening des <i>Bacillus</i> thermophiles et hyperthermophiles.....	25
4.1-Les méthodes de screening pour l'identification des souches de <i>Bacillus</i>	25
4.2-Les méthodes de recherche des activités antimicrobiennes.....	26
4.2.1- Screening primaire.....	26
4.2.2- Screening secondaire.....	26
<i>Matériels et méthodes</i>	
1-Description de la source thermique D'bagh (Guelma).....	29
2- chantillonnage	29

3- Pré-screening des <i>Bacillus thermophiles</i>.....	30
3.1- Isolement	30
3.2-Purification.....	30
4- conservation des isolats	31
5- Identification phénotypique des isolats	31
5.1- Caractères microscopiques et macroscopiques.....	31
5. 2- Caractérisation biochimique.....	31
5.2.1- Test de Catalase	31
5.2.2- Test Mannitol-Mobilité	31
5.2.3- Test de type respiratoire.....	32
5.2.4- Hydrolyse de l'amidon	32
5.2.5- Test de la lécithinase.....	32
5.2.6- Hydrolyse de la caséine	32
5.2.7- Hydrolyse des Tween 80.....	33
5.2.8- Tests de la galerie API 20^E.....	33
6- Activité antimicrobienne des souches isolées.....	33
6.1- Technique des cylindres d'Agar	34
6-2- Technique des puits	34

Résultats et discussion

1- Isolement et purification des isolats.....	36
2- Identification phénotypique des isolats	36
2.1- les caractères microscopiques et macroscopiques des isolats.....	36
2.2- Identification biochimiques des isolat.....	38

2.3- Activités enzymatiques.....	39
2.4- Résultats de la plaque API 20^E	40
3- Résultats du Activité antimicrobienne des souches isolées.....	41
3.1- Technique des cylindres d'Agar.....	41
3.2- Technique des puis	44
4- Discussion.....	45
Conclusion et perspectives.....	49

Annexe

Références bibliographiques

Liste des tableaux

- ❖ Tableau N°1 - Diversité et caractéristiques de certains micro-organismes hyperthermophiles d'isolement dans les environnements hydrothermales (Bustard et al., 2000).....P 16
- ❖ Tableau 2: Germes test de référence utilisés.....P 34
- ❖ Tableau N°3 : Aspects macroscopique et microscopique des souches sélectionnées.....P 36
- ❖ Tableau N°4 : résultats des tests biochimiques.....P 38
- ❖ Tableau N°5 : résultats de la plaque API 20^E.....P40
- ❖ Tableau N°6 : Résultats du test de la technique des cylindres d'agar.....P43
- ❖ Tableau N°7 : Résultats du test de la technique des puits.....P 44

Liste des figures

- ❖ Figure N°1 : Arbre phylogénétique universel basé sur les petites sous unités de l'ARN ribosomal Les branches de l'arbre en rouge gras représentent les hyperthermophiles (Stetter, 2011 in GOMRI, 2012).....P 14
- ❖ Figure N°2 : L'arbre phylogénétique montrant la position de la souche 3s-1T dans le rayonnement du bacille la barre du groupe 5. de 16S ARNr, 1 a impliqué la substitution de nucléotide par 500 nucléotides (Caccamo et al., 2012).....P 22
- ❖ Figure N°3 : Arbre phylogénétique basé sur des ordres de 16S ARNr des souches des *Bacillus* (Lisboa et al., 2006).....P 23
- ❖ Figure 4 : Localisation de la source thermale étudié sur la carte (Source : Google Earth).....P29
- ❖ Figure5 : La source Hydrothermale.....P30
- ❖ Figure N°7 : Aspects macroscopique des souches sélectionnées.....P 37
- ❖ Figure N°6 : Aspects microscopique des souches sélectionnées.....P 37
- ❖ Figure N°6 : Activités enzymatiques.....P 39
- ❖ Figure N°7: les zones d'inhibition de la technique des cylindres d'agar.....P 42

INTRODUCTION

Introduction générale

Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles des environnements chauds tels que les sources thermales terrestres possèdent des capacités d'adaptations moléculaires intéressantes et constituent ainsi une importante source de molécules bioactives peu conventionnelles issues de mécanismes biochimiques et moléculaires uniques. Les enzymes hydrolytiques de ces organismes offrent des avantages majeurs et fournissent de nouvelles possibilités soit de l'amélioration ou de la création de nouveaux procédés biotechnologiques (**GOMRI, 2012**).

Les micro-organismes peuvent vivre à des températures avoisinant et même dépassant 100°C. Ces bactéries thermophiles prolifèrent au voisinage des sources chaudes terrestres et sous-marines.

La découverte des sources hydrothermales profondes mais de manière plus générale l'étude de milieux extrêmes, ont ouvert la voie à la mise en évidence de microorganismes bien adaptés à ces conditions atypiques et capables de synthétiser de molécules d'intérêt biotechnologique (**Guezennec, 2004**).

L'étude de communautés microbiennes de sources hydrothermales profondes consiste d'une part en une analyse directe des ARNr 16S par amplification et hybridation in situ, d'autre part dans l'enrichissement de différents types métaboliques à haute température, et enfin dans la caractérisation de souches isolées d'environnements hydrothermaux. Des séquences d'Archaea méthanogènes, halophiles ou hyperthermophiles affiliées aux Methanosarcinales ou aux Thermococcales. (**corre et al., 2000**).

Au sein des fluides hydrothermaux, des enrichissements de différents types métaboliques associés au métabolisme du soufre et du méthane ont été positifs à 65 et 80°C. Une grande diversité de séquences a par ailleurs été observée (**corre et al., 2000**).

En dépit de l'intérêt accru pour les hyperthermophiles et du taux de découverte de nouvelle espèce, leur potentiel dans l'industrie de biotechnologie n'a pas été entièrement réalisé jusqu'ici. La caractérisation physiologique et les mécanismes biochimiques de survie des bactéries et des archéobactéries hyperthermophiles marines sont actuellement à l'étude. Cependant, l'information très petite sur leur application dans des systèmes de bioprocédé est disponible. Puisque seulement une fraction des océans du monde a été explorée, le potentiel

pour isoler des souches originales des hyperthermophiles marins est significatif et par conséquent elles représentent, jusqu'ici, la ressource biotechnologique inexploitée. Bien que beaucoup de recherches se soient concentrées sur l'extraction des enzymes thermoactives, des applications entières de cellules ont été relativement négligées. Les systèmes courants de bioprocédé utilisant les hyperthermophiles marins posent un ensemble intéressant d'objectifs, tels que l'opération de bioréacteur de température élevée et la réduction de corrosion de matériaux, pour la conception de bioréacteur et la manipulation de leurs produits. **(Bustard et al., 2000)**

Les enzymes et composés organiques des thermophiles sont convoités pour divers procédés se déroulant à haute température et intéressant des domaines aussi variés que la chimie, la pharmacie, l'agro-alimentaire, ou encore la biologie moléculaire. Les enzymes issus des microorganismes des sources hydrothermales présentent un potentiel important en raison de leur thermostabilité et leur aptitude à résister à la dénaturation sous pression du fait de la piézophilie ou de la piézotolérance de leurs hôtes. **(Alain et al., 2010)**

Notre modeste étude s'inscrit alors cette optique, nous avons choisi une source hydrothermale de Guelma connue pour sa température élevée (98°C) comme site d'étude pour le screening de *Bacillus* thermophiles et hyperthermophiles, notre synthèse bibliographique consiste à montrer l'importance des extrémophiles en général et les *Bacillus* en particulier issus d'écosystème tels que les sources hydrothermales et puis nous citons les techniques de screening rapportés dans la littérature.

Et concernant la partie expérimentale, elle est structurée en trois parties initiées par la méthodologie qui suivie un pré- screening des bactéries des *Bacillus*, leurs identification phénotypique, leur activités hydrolytiques extracellulaires s'ensuivra les techniques de pré-screening des activités antimicrobiennes. La seconde partie expose les résultats obtenus et leur discussion. Enfin, la troisième partie subie une conclusion générale et des perspectives.

SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les Bactéries extrêmophiles

1.1- Historique

Le concept d'extrêmophile a été forgé à partir des travaux de microbiologistes qui ont eu un rôle de pionnier en découvrant de nouvelles espèces de micro-organismes dans des milieux considérés jusque-là comme stériles. A la fin des années soixante, **Brock** découvrit les premières espèces se développant à des températures de l'ordre de 70 °C dans des sources thermales du parc de Yellowstone aux États-Unis. En 1969, il isola en particulier *Thermus aquaticus* qui sera à la base de la découverte des ADN polymérases thermostables (**BROCK et FREEZE, 1969**).

. À la même période, **Horikoshi**, au Japon, mettait en évidence l'existence de microbes ne se développant qu'à des pH alcalins et passés presque totalement inaperçus auparavant. Puis les microbiologistes allemands **Zillig et Stetter** allaient donner une impulsion déterminante en explorant systématiquement les milieux extrêmes de la planète, avec une prédilection marquée pour le chaud et la mise en évidence d'espèces ayant un optimum de croissance supérieur à 100 °C. *Pyrolobus fumari* est notamment capable de survivre à 121 °C, température à laquelle sont effectuées les opérations de stérilisation courantes en laboratoire et dans l'industrie. De 1980 à 2000, le laboratoire de **Stetter** isola plus de 50 nouvelles espèces appartenant à de nouveaux genres, voire de nouvelles familles. De ces travaux et de ceux consacrés à d'autres types d'environnements émergea le concept d'extrêmophile (**QUÉRELLOU et al., 2013**).

Les extrêmophiles sont des micro-organismes qui se développent de manière optimale dans des conditions de milieux mortelles pour la quasi-totalité des autres espèces.

1.1.1- Environnements extrêmes et extrêmophiles

Sur la base de la définition donnée ci-dessus, l'exploration des environnements extrêmes sur Terre constitue une entreprise de longue haleine qui n'est que partiellement réalisée à l'heure actuelle. Les principaux paramètres physico-chimiques pris en considération sont la température, le pH, la teneur en eau, la pression et l'osmolarité du milieu extérieur. Ces

facteurs du milieu peuvent agir isolément ou en combinaison de deux ou plus, définissant ainsi des niches écologiques extrêmes où se développent des espèces polyextrêmophiles. D'autres paramètres comme la résistance aux rayonnements ionisants sont parfois retenus. Une forte intensité en rayonnement ionisant n'est toutefois pas une condition indispensable au développement de souches radiorésistantes telles que *Deinococcus radioduran*. On parlera dans ce cas de tolérance extrême.

Les sources thermales terrestres, hydrothermales côtières ou océaniques profondes dont les températures peuvent, pour les premières, aller jusqu'à 100 °C et, pour les dernières, 350 °C du fait des pressions hydrostatiques rencontrées. Les sources thermales terrestres et côtières sont très répandues sur tous les continents dans les régions au volcanisme actif. Les sources hydrothermales profondes océaniques sont majoritairement situées sur les dorsales médio-océaniques actives (dorsale Médio-Atlantique, ride Est-Pacifique) ou les sites arrière-arcs actifs (Fidji, Okinawa, etc.). Ces sites sont les milieux de prédilection des thermophiles et des hyperthermophiles. De plus, de nombreuses sources présentent des pH acides, voire très acides où se développent des acidophiles et/ou des acido-thermophiles. Quelques rares sources hydrothermales, telle que Lost City (dorsale Médio-Atlantique) présentent des pH alcalins qui supportent le développement de souches alcaliphiles ou alcali-thermophiles. Les sources hydrothermales les plus profondes connues (Ashadzé, 4 100 m) ont en outre permis d'isoler des souches telles que *Pyrococcus yayanosii* se développant uniquement dans une gamme de pression de 20 à 120 MPa, qualifiées de piézophiles (ou barophiles) strictes (ROUSSEL *et al.*, 2008).

- Une autre frontière particulièrement intéressante est celle de la limite de la vie dans les sédiments profonds du plancher océanique qui, en certains endroits en fonction de l'âge et de l'abondance de sédiments, peuvent atteindre 10 km d'épaisseur (voir site Internet NOAA dans le Pour en savoir plus). Jusqu'en 1955 les chercheurs pensaient que la vie était impossible au-delà de 7 m de profondeur dans les sédiments. Grâce au projet international ODP (*Ocean Drilling Project*), les forages profonds ont mis en évidence la présence de groupes microbiens vivants jusqu'à des profondeurs de 1 600 m sous le plancher océanique. Les extrêmophiles correspondants – piézo-thermo ou piézo-hyperthermophiles, dont les signatures moléculaires ont été mises en évidence, n'ont toutefois pas pu être cultivés à ce jour.

D'autres espèces d'extrêmophiles restent à découvrir dans des sites très difficiles d'accès soit pour des raisons physiques (cas des lacs sous-glaciaires de l'Antarctique) ou en raison d'une

instabilité politique chronique comme les sources salées, acides et chaudes du site de Dallol dans le triangle des Afars en Éthiopie où il devrait être possible de trouver des halo-acido-hyperthermophiles. (QUÉRELLOU *et al.*, 2013).

1.1.2- Biodiversité exceptionnelle. Collections limitées

- Les micro-organismes constituent à la fois en masse, en nombre et en diversité l'ensemble le plus important sur la planète. Ils jouent des rôles fondamentaux dans les cycles géochimiques mais aussi dans le fonctionnement de l'ensemble de la biosphère. Ils contrôlent aussi le fonctionnement des organismes supérieurs, y compris l'homme, en raison des associations complexes issues de l'évolution. En dépit de cette importance fondamentale et de plus d'un siècle et demi de travaux en microbiologie, seules 7 031 espèces procaryotiques ont été caractérisées à ce jour et validement décrites selon les normes de l'ICSP (International Committee on Systematics of Prokaryotes ; voir site Internet dans le Pour en savoir plus). Ces normes impliquent notamment la culture des micro-organismes et leur dépôt dans deux collections internationales. Or, les approches moléculaires développées à partir des années 1980-1990 puis celles de métagénomique, mises en œuvre plus récemment, ont démontré l'existence d'une biodiversité microbienne considérable dans la plupart des milieux. Et ont démontré, par voie de conséquence, que seule une fraction infime de cette biodiversité est aujourd'hui cultivable avec les méthodes connues, estimée à 0,01 % voire 1 % selon les milieux (AMANN *et al.*, 1995) .

La biodiversité microbienne en milieu extrême varie de manière considérable selon le niveau d'extrémophilie et aussi en fonction des sources d'énergie et des donneurs et accepteurs d'électrons disponibles. Elle est nulle dans les fluides hydrothermaux dont les températures dépassent fréquemment 200 °C. Elle peut être réduite à une seule espèce de bactérie (*Candidatus Desulforudis audaxviator*) comme dans le cas des eaux souterraines acides de drainage d'une mine d'or par 2,8 km de profondeur . Elle est faible dans de nombreuses niches écologiques extrêmes, comme les cheminées hydrothermales de Lost City. Mais elle peut aussi être très élevée pour certaines sources hydrothermales profondes lorsque les sources d'énergie sont abondantes et qu'un écosystème complexe parvient à s'établir (CHIVIAN., *et al* 2008).

• Les souches d'extrêmophiles isolées par des méthodes culturales depuis une quarantaine d'années se comptent par milliers, généralement stockées dans les laboratoires de recherche ayant réalisé les travaux. La diffusion de ces souches est généralement libre pour les activités de recherche, mais contrôlée pour des applications biotechnologiques. En revanche, les nouvelles espèces isolées, caractérisées, décrites et validées par l'ICSP se limitent à quelques centaines. Ces souches sont déposées dans les collections internationales de micro-organismes (CIP, DSMZ, ATCC, JCC) et accessibles sur commande (BSR) **Klouche 2007,2009**. Elles sont réparties entre les domaines *Archaea* et *Bacteria* et présentent des métabolismes extrêmement divers reflétant les conditions physico- chimiques locales. Certaines familles d'archées sont constituées exclusivement d'extrêmophiles, à l'instar des *Thermococcales* ou des *Archaeoglobales* qui sont des hyperthermophiles anaérobies isolées de sources thermales et hydrothermales. D'autres familles d'archées comme les *Methanococcales* comportent des espèces réparties sur l'ensemble de la gamme de température, des psychrophiles, des mésophiles jusqu'aux hyperthermophiles. Au sein du domaine *Bacteria*, la même situation contrastée existe. À titre d'exemple, la famille des *Thermotogales* ne comporte que des espèces thermophiles souvent isolées à partir des sources hydrothermales mais aussi des réservoirs pétroliers. À l'inverse, le genre *Bacillus*, qui comporte 228 espèces décrites à ce jour, présente une majorité de non-extrêmophiles. Toutefois, la minorité de *Bacillus* extrêmophiles possède des propriétés très intéressantes. Ainsi à titre d'exemples :

- *B. stearothermophilus* est une thermophile décrite dès 1920 ;
- *B. halodurans* est une alcaliphile, capable de se diviser de pH 7 à pH 11, très utilisée dans l'industrie ;
- *B. stratosphorus*, isolée à partir d'échantillons prélevés à 41 km d'altitude, est une alcaliphile résistante aux UV et dont les spores supportent les conditions de la stratosphère ;
- *B. arseniciselenatis* est une halo-alcaliphile capable de réduire l'arsenate.

Cette diversité souligne aussi la plasticité de certains groupes microbiens (**QUÉRELLOU et al., 2013**).

1.1.3- Accessibilité inégale

L'accès le plus immédiat aux micro-organismes extrêmophiles à des fins de biotechnologie consiste à rechercher dans les banques internationales les souches dont le profil correspond *a priori* au mieux au cahier des charges du ou des produits recherchés. Une autre approche consiste à prendre contact avec les laboratoires de recherche universitaires ou des organismes de recherche impliqués dans ce domaine et à négocier l'utilisation de souches isolées et stockées dans les collections de laboratoire (**LENTZEN et SCHWARZ, 2006**).

D'une manière générale, l'isolement de souches d'extrêmophiles exige des compétences spécialisées qui ne recoupent que très partiellement celles nécessaires à la découverte de produits innovants et à leur développement en un produit commercial.

De plus l'accès à certains environnements extrêmes, tels que les sources hydrothermales profondes, est très limité par le fait qu'il requiert l'usage d'équipements lourds, navires, sous-marins habités ou robots grande profondeur. Ces engins sont disponibles dans seulement quelques pays développés. Une difficulté supplémentaire vient souvent se rajouter aux précédentes. Les ressources vivantes sous juridictions nationales sont considérées comme faisant partie du patrimoine des différents États. Les extrêmophiles n'échappent pas à cette règle. Bien au contraire. Beaucoup de pays interdisent d'ores et déjà tout prélèvement en milieu extrême afin de protéger leurs intérêts, à commencer par les pays développés (USA, Nouvelle-Zélande, Islande, etc.) (**QUÉRELLOU et al., 2013**).

1.2- Propriétés des extrêmophiles

Le concept d'extrémophilie, à la différence de celui de résistance aux conditions extrêmes, implique que l'ensemble de la machinerie cellulaire soit adapté aux conditions extrêmes et que les cellules fonctionnent de manière optimale dans ces conditions. Pour autant, chaque constituant cellulaire ne fonctionne pas nécessairement à l'optimum dans les conditions du milieu extérieur. Les cellules sont capables de contrôler jusqu'à un certain point les conditions intracellulaires pour certains paramètres comme l'osmolarité. De ce fait, le pH intracellulaire de souches alcaliphiles sera inférieur à celui du milieu extérieur et inversement pour les espèces acidophiles. En revanche, pour certains paramètres, comme la température, la pression, les conditions du milieu extérieur s'imposent aux cellules dans leur globalité, membranes, milieu intérieur et totalité des constituants cellulaires. Ces constituants cellulaires

devront être non seulement stables dans ces conditions, mais surtout, fonctionnels. La stabilité de chacune des biomolécules prise isolément et testée dans les conditions du milieu extérieur n'est toutefois pas toujours requise, du fait que le milieu intérieur peut bénéficier de l'effet de certains solutés organiques ou d'une protection au sein de complexes macromoléculaires.

Nous n'illustrerons ici que certaines propriétés, et plus particulièrement la thermostabilité des protéines et l'osmoadaptation (QUÉRELLOU *et al.*, 2013).

1.3- Applications biotechnologiques

Les extrêmophiles représentent une nouvelle frontière pour la biotechnologie. Les travaux de recherche sur les extrêmophiles sont pour une grande part motivés par les applications biotechnologiques déjà acquises et par celles susceptibles de reposer sur des biomolécules aux propriétés nouvelles pouvant déboucher sur le développement de nouveaux produits. En raison des pratiques en vigueur dans les laboratoires de recherche et dans l'industrie, il est souvent difficile de documenter les chemins ayant conduit de la source (extrêmophile) à un produit ou un procédé. Plusieurs milliers d'articles sont consacrés à ce domaine en pleine expansion. Il est possible d'aborder ce chapitre sous plusieurs angles :

- par groupes d'extrêmophiles ;
- par type d'applications industrielles ;
- par grandes familles d'enzymes et de produits.

Nous avons privilégié cette troisième approche(en particulier, recherche d'activités antimicrobiennes).

Néanmoins, d'excellentes synthèses existent par groupes d'extrêmophiles qui permettent au lecteur d'aborder les applications biotechnologiques sous cet angle : citons pour les propriétés et les applications liées aux psychrophiles les synthèses de (CAVICCHIOLI, *et al* 2002).

Pour les alcaliphiles l'ouvrage de référence de K. Horikoshi, les thermophiles et hyperthermophiles l'article de (SIDDIQUI et CAVICCHIOLI, 2006).

. Pour les piézophiles, une synthèse récente met l'accent sur le comportement des enzymes issues de modèles piézotolérants, soulignant par contraste l'absence de travaux sur les enzymes de piézophiles strictes.

On peut distinguer deux types d'applications différentes. La première repose sur l'utilisation directe des organismes. C'est le cas en particulier pour les applications liées à la bioremédiation (ensemble des procédés visant à la restauration d'un écosystème grâce à la stimulation des populations microbiennes indigènes ou à l'apport de populations adaptées) et à la biolixiviation (ou procédé dans lequel les microbes sont utilisés pour le traitement des minerais). Le second type d'applications repose sur l'utilisation des biomolécules issues des extrémophiles. Ce sont les enzymes, mais aussi les protéines, les lipides, les polymères, les extrêmolytes et une grande diversité de métabolites secondaires. L'ensemble constitué des cellules, des ressources génétiques et des biomolécules listées ci-dessous regroupe ce que nous qualifions au sens large d'actifs biotechnologiques (QUÉRELLOU *et al.*, 2013).

2. Les bactéries thermophiles et hyperthermophiles

2.1-Les Bactéries thermophiles

Thermophiles sont un groupe d'organismes caractérisés par leur capacité de vivre et s'épanouir en conditions exceptionnellement dures des températures. Pendant la décennie passée, les thermophiles ont produit du grand intérêt des perspectives de la science fondamentale et appliquée. De point de vue biotechnologique, les thermophiles sont d'intérêt comme sources des enzymes uniques avec les propriétés peu communes, en tant qu'agents actifs dans la fermentation à hautes températures, dans des processus de traitement des déchets, et en lixiviation minérale (**Brock., 1986 et Kelly et al., 1994 in Fandi et al., 2012**).

2.2- Les Bactéries hyperthermophiles

Les hyperthermophiles sont capables de la croissance entre 85°C et 113°C jusqu'ici et sont trouvés dans les environnements tels que les passages hydrothermiques et peu profonds qui peuvent être caractérisés par une large variété de conditions physico-chimiques. Bien que plus des secteurs diffus d'extrusion liquide géothermique puissent également se produire dans les environnements hydrothermales, ce ne sont généralement pas assez chauds pour permettre les hyperthermophiles survivent. Les marins hyperthermophile contiennent un certain nombre d'adaptations biochimiques pour résister, non seulement des températures (à 113°C), mais également à la présence des produits chimiques toxiques, au manque de lumière, au manque de l'oxygène, aux niveaux nutritifs bas et extrêmement à la pression (au moins à 110MPa) (**Hazem et al., 2009**).

Beaucoup utilisent des voies métaboliques originales, telles que le métabolisme chimoilithautotrophe du soufre élémentaire, par exemple (**Stetter et al., 1996 in Bustard et al., 2000**). Les hyperthermophiles également ont les protéines extrêmement thermostables et utilisent des stratégies originales, telles que l'histone thermostable comme des protéines, l'enroulement superbe d'ADN et de tétra membranes d'éther, pour stabiliser les acides nucléiques et les macromolécules dans leur environnement (**Baross et al., 1996 in Bustard et al., 2000**). Par conséquent, en raison de ces propriétés uniques et de leur stabilité inhérente, des hyperthermophiles peuvent être appliqués à de vrais environnements de processus pour la fabrication des composés de spécialiste, ou à perfectionnement des méthodes existantes.

En ces dernières années, plusieurs revues ont traité intensivement la phylogénie et la physiologie de hyperthermophiles. Cependant, l'information très petite est disponible dans la littérature au sujet des aspects de génie chimique de leur application.

2.3-Les micro-organismes des sources hydrothermales

Les sources hydrothermales émettent des fluides à très haute température à partir de cheminées de sulfure. Elles sont appelées « fumeurs noirs » en raison de la couleur des précipités se formant lorsque le fluide hydrothermal à 350 °C, hautement réduit, se mélange avec l'eau de mer ambiante, froide et oxygénée. Leurs caractéristiques physico-chimiques se distinguent de l'eau de mer environnante par le faible pH, de fortes concentrations en gaz dissous (H₂, CH₄, Co, CO₂, H₂) et en métaux (Si, Fe, Mn, etc.). Ces différents composés constituent des sources d'énergie utilisables par les bactéries chimiosynthétiques autotrophes, capable de transformer le dioxyde de carbone en carbone organique. Ces bactéries chimiolithotrophes ont une grande importance puisqu'elles assurent la production primaire des écosystèmes hydrothermaux sous-marins qui représentent de véritables « oasis » de vie animale. En effet, de riches communautés s'y développent, contrastant fortement avec l'apparence désertique du plancher océanique. On y trouve des micro-organismes vivant en symbiose dans des organismes (vestmentifères), ainsi qu'une grande diversité de bactéries vivant soit librement dans le mélange hydrothermal, soit fixées sur des supports comme les roches, les parois de cheminées... Les sources hydrothermales d'origine océanique sont un exemple d'environnements extrêmes où l'on trouve une biodiversité microbienne tout à fait remarquable. La caractérisation de ces organismes et de leur machinerie cellulaire parfaitement adaptée pour fonctionner dans ces conditions de température (+ 2 à + 100 °C), de pression (200 à 1 000 bars) font l'objet d'une recherche intensive. L'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer) a organisé et participé depuis plus d'une dizaine d'années à plusieurs campagnes océanographiques afin d'étudier de tels sites géothermiques et de se constituer une collection de micro-organismes hydrothermaux. Parmi les molécules étudiées, les enzymes hyperthermostables provenant de ces microorganismes extrêmes présentent un intérêt réel que ce soit dans les domaines du diagnostic (ADN polymérase, ADN ligase), de la chimie (alcool déshydrogénase, estérase...), de l'agroalimentaire (β -glucosidase, amylases...), ou de bien d'autres secteurs encore avec les protéases, les cellulases... (Dietrich et al., 2002).

2.4- La physiologie de hyperthermophiles

Les hyperthermophiles sont isolés dans une gamme d'écosystèmes sujets aux conditions extrêmes, il doit être prévu que leur physiologie puisse différer de manière significative des micro-organismes non-extrêmes (**Bustard et al., 2000**).

2.5-Écologie des hyperthermophiles des sources hydrothermales et des fonds marins

Contrairement aux micro-organismes mésophiles plus conventionnels (bactéries, mycètes, levure et algue), ayant une croissance aux températures s'étendant de 10°C à 50°C, les espèces thermophiles de modérées se développent entre 50°C et 65°C.

Ceux-ci incluent une diversité large des bactéries telles que les genres chimoilithautotrophe, hétérotrophes et photosynthétiques (**Wiegel et al., 1986 in Bustard et al., 2000**). À des températures ambiantes plus élevées, les micro-organismes extrêmement thermophiles montrent la croissance entre 65°C et 85°C, avec les bactéries des profonds et les archéobactéries hyperthermophiles préférant les températures de 85-113°C (**Kato et al., 1996 in Bustard et al., 2000**). De tels hyperthermophiles peuvent montrer de légères différences des thermophiles modérés au biochimique et au niveau moléculaire, permettant la survie dans leur place écologique spécifique (**Woese et al., 1990 in Bustard et al., 2000**). L'arbre 16S phylogénétique basé par ARNr suggéré est montré dans la figure 1 et indique le rapport entre les exemples hyperthermophile des profonds, les bactéries mésophiles et l'eukarya. Jusqu'ici, plus de 60 espèces des hyperthermophiles et terrestre y compris) ont été décrits, représentant une diversité inopinément élevée puisque peu d'isolats montrent des rapports spécifiques avec d'autres taxonomie.

d'électron et les donneurs suffisants sont présents (**Horikoshi et al., 1998 et Karl et al., 1995 in Bustard et al., 2000**). Quelques exemples des espèces hyperthermophiles, et leurs caractéristiques et les conditions métaboliques sont montrés dans le tableau 1. L'isolement réussi de ces hyperthermophiles a été réalisé des circuits de mise à l'air libre hauturiers et des secteurs connexes tels que le fluide géothermique, structures jointes de sulfure, nattes microbiennes, sédiments chauds et des créatures vivant sur des sulfures. Cependant, les températures liquides géothermiques réelles qui ont rapporté les micro-organismes hyperthermophiles viables ont été décrites bien au-dessus de 113°C, qui est simplement la température admise maximum de croissance d'un hyperthermophile d'isolement et cultivables (**Baross et al., 1995 et Juniper et al., 1995 in Bustard et al, 2000**).

Généralement, les hyperthermophiles d'isolement dans les passages hauturiers peuvent également résister extrêmement à des pressions (à 110MPa). Par exemple, le marianensis de *Thermaerobacter*, une bactérie extrêmement thermophile aérobique, a été isolé dans le fossé 11000m profond et montre la croissance à 80°C (**NICOLAUS., 2000**).

Comprenant l'équilibre important entre la température, la pression et leur effet sur le métabolisme microbien peuvent rapporter l'information et des principes utiles dans la technologie de bioprocédé. Les hyperthermophiles peuvent survivre dans une gamme des conditions extrêmes, et la plus grande compréhension de leurs caractéristiques et le phénomènes de transport physiologiques peut permettre industriellement à des réactions biochimiques appropriées d'être intensifiée (**Bustard et al., 2000**).

Tableau N°1 - Diversité et caractéristiques de certains micro-organismes hyperthermophiles d'isolement dans les environnements hydrothermales (Bustard et al., 2000)

Genus	T_{max} (°C)	Substrate	Acceptors	Environment and Observations	Ref
Bacteria					
<i>Thermotoga</i>	90	Pep, CHO	S^0/H^+	sm+ds, pH 5.5-9, AN, rod cells	24
<i>Aquifex</i>	96	S^0/H_2	O_2, NO_3^-	sm, pH 5.4-7.5, AE, rod cells	25
Archaea					
<i>Methanopyrus</i>	110	H_2	CO_2	sm+ds, pH 5.5-7, AN, chains of rods	26
<i>Methanococcus</i>	91	H_2	CO_2	ds, pH 5-7.5, AN, irreg cocci	27
<i>Ferroglobus</i>	96	Fe^{2+}, H_2, S^{2-}	$NO_3^-, S_2O_3^{2-}$	sm, pH 6-8.5, AN, irreg cocci	28
<i>Archaeoglobus</i>	92	CHO, (H_2)	$SO_4^{2-}, S_2O_3^{2-}$	sm+ds, pH 5.5-7.5, AN, irreg cocci	29
<i>Pyrolobus</i>	113	H_2	$NO_3^-, S_2O_3^{2-}, O_2$	sm+ds, pH 4-6, AN, lobed cocci	30
<i>Aeropyrum</i>	100	Pep	O_2	sm, pH 5-9, AE, irreg cocci	31
<i>Pyrobaculum</i>	103	Pep, H_2	S^0, O_2, NO_3^-	sm+ds, pH 5-7, AN, rod cells	32
<i>Pyrococcus</i>	106	Pep, CHO	S^0, H^+	sm+ds, pH 5-9, AN, cocci	33
<i>Pyrodictium</i>	110	Pep, CHO, H_2	S^0, H^+	sm+ds, pH 5-7, AN, fibrous discs	34
<i>Staphylothermus</i>	98	Pep	S^0, H^+	sm+ds, pH 4.5-8.5, AN, cocci clusters	35

Key: Pep - peptide substrate; CHO - carbohydrate substrate; S^0 - elemental sulfur; sm - shallow marine isolation; ds - deep sea environment; AE - aerobe; AN - anaerobe.

2.6- Culture de hyperthermophiles

Car les hyperthermophiles marins exigent des températures, par rapport aux mésophiles, ceci soulève un certain nombre de défis de technologie pour l'opération de bioréacteur. Ceux-ci incluent l'entretien de la température élevée et la réduction de perte par évaporation des contenants des milieux liquides (Bustard et al., 2000).

2.6.1 Métabolisme hyperthermophile

La recherche sur la physiologie et la biochimie des hyperthermophiles a été entravée par des difficultés dans leur culture (Zhang et al., 1997 in Bustard et al., 2000). L'examen de ces espèces hyperthermophiles a indiqué que plusieurs espèces sont hétérotrophes, comme démontré par des espèces de *Thermatoga* et des espèces d'*Archaeoglobus*. Cependant, puisque la majorité des organismes sont chimoilithautotrophique, les donneurs d'électrons alternatifs utilisés incluent par *Pyrobaculum* et *Aquifex*, Fe (III) et sulfure par *Ferroglobus* et H_2 par les methanogens. Certaines espèces de *Ferroglobus*, d'*Archaeoglobus*, de *Pyrolobus* et de *Pyrodictium* emploient également le H_2 obtenu à partir du passage hydrothermique lui-même

(Adams., 1999 in Bustard et al., 2000). Pour améliorer la croissance de beaucoup de hyperthermophiles, des substrats à base de protéines complexes tels que l'extrait de levure ou la peptone ont été utilisés (Fiala et al., 1986 in Bustard et al., 2000). Cependant, certaines espèces de *Pyrococcus*, de *Thermococcus* et de *Desulfurococcus* ont été montrées pour se développer sur seuls des acides aminés (Rinker et al., 1999 in Bustard et al., 2000). Quoique la plupart de ces organismes hyperthermophiles soient protéolytiques en nature, uns sont également saccharolytic. La bactérie *Thermatoga* utilise des hydrates de carbone, et même l'utilisation des éléments de saccharide de monomère peut se produire (Kengen et al., 1996 in Bustard et al., 2000). Plusieurs des études jusqu'ici sur la culture hyperthermophile ont été comparées aux travaux menés à bien using le furiosus de *Pyrococcus*. Ce micro-organisme, d'isolement par Stetter et al d'un passage volcanique, a été étudié intensivement dans le monde entier et par conséquent, a permis la plus grande compréhension des voies métaboliques, les rapports thermostables de structure d'enzymes et de fonction, la caractérisation archaeal génétique et les techniques culturelles des hyperthermophiles (Sharp et al., 1996 in Bustard et al., 2000).

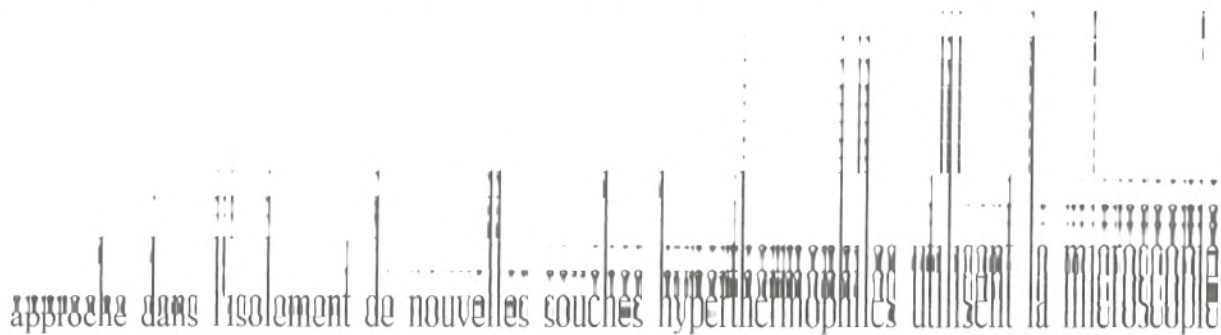
2.6.2 Croissance des hyperthermophiles

Une grande partie de la recherche initiale étudiant la culture hyperthermophile a été effectuée sur une petite échelle en lots dans le laboratoire de 100cm³ à 2dm³. On a observé des problèmes tels que la fonte des boîtes de Pétri En plastique, de la perte par évaporation et de la stabilité des aliments aux températures au-dessus de 100°C (Taylor., 1984 in Bustard et al., 2000). En concevant des bioréacteurs pour l'usage des hyperthermophiles, une telle cause de conditions extrêmes a augmenté la détérioration des scellements et des garnitures en caoutchouc. Dans des réacteurs avec les pièces mobiles, telles que les réacteurs de réservoir remués ou les réacteurs d'écoulement déroutés oscillants, il y a des problèmes additionnels des scellements et du graissage qui sont aggravés par les températures accrues (Zhang et al., 1997 in Bustard et al., 2000).

Puisque la plupart des hyperthermophiles ont été découverts relativement récemment, les milieux de croissance n'ont pas encore été optimisés ou bien définis. Les études indiquent que la majorité de hyperthermophiles examinés jusqu'ici ont besoin des milieux complexes pour la cultivabilité raisonnable de cellules (Krahe et al., 1996 in Bustard et al., 2000). Dans des conditions de croissance, telles que les températures jusqu'à 113°C, les aliments de milieux

peuvent réagir abiotique. Dans ces réactions, des acides aminés sont décomposés et les hydrates de carbone peuvent subir des réactions Maillard, qui ont comme conséquence une réduction de disponibilité nutritive dans les milieux, et donc une réduction du nombre de cellules (**Raven et al., 1997 in Bustard et al., 2000**). Gonzalez et al (**Gonzalez et al., 1998 in Bustard et al., 2000**) a étudié la cultivabilité d'un hyperthermophile anaérobie, *peptonophilus* de *Thermococcus*, pendant les étapes de survie aux températures de 4°C à 98°C. C'est le premier rapport pour prouver l'existence des cellules hyperthermophiles dans plusieurs états physiologiques (cellules cultivables, cellules non-cultivables actives, cellules non-cultivables inactives et cellules mortes), de ce fait indiquant les problèmes potentiels s'est associé dans la caractérisation physiologique et biochimique.

Le bac de teinture et le Huber (**Beck et al., 1997 in Bustard et al., 2000**) ont développé une approche universelle pour la discrimination rapide des hyperthermophiles viables et non viables utilisent des colorants fluorescents. Ils proposent également l'application de cette



approche dans l'isolement de nouvelles souches hyperthermophiles utilisant la microscopie optique de laser.

2.7 - Applications industrielles et de technologie des hyperthermophiles

Puisque les hyperthermophiles ont plusieurs caractéristiques physiologiques et métaboliques uniques, ceux-ci peuvent être avec succès exploités dans l'industrie de biotechnologie dans une étendue des applications. Ceux-ci peuvent inclure des métabolisations, la biocatalyses, la bioremédiation ou la production composée bioactive, par exemple, par lequel les cellules hyperthermophiles entières ou les enzymes thermostables purifiées puissent s'avérer utile (**Niekhaus et al., 1999 in Bustard et al., 2000**). Puisque l'industrie est concernée par l'intensification de processus, par le roman et hautement - efficace conduit, pour la plus grande fabrication du produit, l'utilisation des hyperthermophiles, en même temps que la technologie de bioprocédé, peut offrir une contribution significative.

2.7.1- Application des hyperthermophiles des profonds en technologies de bioremédiation

En plus des efforts de recherche dans la découverte et l'application thermostables d'enzymes, les cultures des hyperthermophiles peuvent avoir le potentiel dans la bioremédiation environnementale. En raison des nombreux processus de fabrication qui se produisent aux températures au-dessus de 70°C, on l'envisage que les occasions existent pour traiter les jets effluents chauds de rebut utilise les micro-organismes hyperthermophiles. Un exemple d'une telle application est la désulfuration de la fumée d'anhydride sulfureux du produit chimique ou des centrales utilisent les hyperthermophiles de sulfite-réduction autotrophes. En conditions anaérobies, le *veneficus* hyperthermophile d'*Archaeoglobus* est capable de ramener le SO₂ à H₂S, utilisant l'hydrogène ou le méthanol en tant que donneur d'électrons. Ceci précède l'oxydation de H₂S au soufre élémentaire dans un deuxième réacteur aérobie, permettant le rétablissement et la réutilisation de cette denrée pure. Ce processus à deux étages de bioremédiation permet également le déplacement des contaminants de métaux lourds, tels que le Cd, le Zn et le Cu, par la précipitation des sulfures en métal par les sources hydrothermales hyperthermophile (Bustard et al., 2000).

3. Le genre *Bacillus*

3.1-Historique

Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* ont une longue et distinguée histoire dans les royaumes de la biotechnologie. Elles étaient probablement des premières employées par le Japonais dans la préparation d'un aliment fermenté traditionnel de paille de riz et de soja, itohiki-natto. Ceci dérive de l'action du « *Bacillus natto* » (un dérivé de *B. subtilis*) sur le soja cuit à la vapeur et des résultats dans un polymère visqueux et collant (principalement acide polyglutamic) ce des formes longues, fils minces une fois touché. Natto a été préparé au Japon pendant au moins quatre cents années, et actuellement la consommation est environ 108 kilogrammes par an (UEDA, 1989).

3.2-Identification du genre *Bacillus*

Un but important de la taxonomie est d'établir un système précis et simple d'identification à partir de la classification. De tels arrangements devraient être universels et permettre l'identification des souches, par exemple, de l'importance médicale, écologique ou biotechnologique, d'une façon non ambiguë.

L'approche traditionnelle à l'identification des *Bacillus* a été basée sur les trois groupes morphologiques. Après avoir assigné un isolat à un de ces groupes, la bactérie a été identifiée à l'espèce de niveau utilisant un panneau des tests physiologiques et biochimiques. Ce système était réalisable, mais la connaissance de ces bactéries était souvent nécessaire afin de distinguer des morphologies de spore. En grande partie pour cette raison, les arrangements postérieurs ont négligé la morphologie de spore (CLAUS et al., 1986), mais d'autre part le nombre de tests pour effectuer une identification a dû être augmenté. Il y avait également le problème du nombre toujours croissant de nouvelle espèce.

L'expansion du genre et de l'intérêt croissant pour ces bactéries a incité le développement des systèmes d'identification automatisés. (BERKELEY et al., 1984) a utilisé des plateaux d'api 50 E (kits miniaturisés chacun permettant l'examen de 50 tests phénotypiques pour une bactérie) pour caractériser un grand nombre de contraintes et à partir des résultats a développé une matrice automatisée d'identification. Une matrice assistée par ordinateur alternative d'identification est fournie par ce laboratoire. Ceci est basé sur 30 tests et 44 espèces. Les tests

incluent physiologique commun et les dispositifs biochimiques tels que l'hydrolyse d'amidon et de caséine, la production acide à partir des sucres, etc., et les 44 taxa représentent toutes les espèces communes. Avec ce système nous pouvons par habitude identifier environ 50% d'isolats environnementaux de bacille. Les contraintes non identifiées représentent vraisemblablement les taxa in décrits que nous n'avons pas dans la matrice ou les variantes des espèces établies.

Des diverses approches chimiotaxonomique disponibles pour l'identification de souches *Bacillus*, la spectrométrie de masse de pyrolyse semble tenir la promesse particulière (**BERKELEY et al., 1984**). La pyrolyse implique la combustion d'un échantillon dans une atmosphère inerte. Les fragments produits sont alors séparés sur la base de leur rapport de masse de charge utilise un spectromètre de masse. Une bibliothèque des pyrograms ou des spectres de masse est tenue dans un ordinateur et quand un nouvel isolat doit être identifié son programme est comparé à la bibliothèque utilise des statistiques multi variables. Ce procédé souffre du manque de reproductibilité et de dérive sur une période ; les programmes préparés à intervalles de six mois donnent souvent différents résultats.

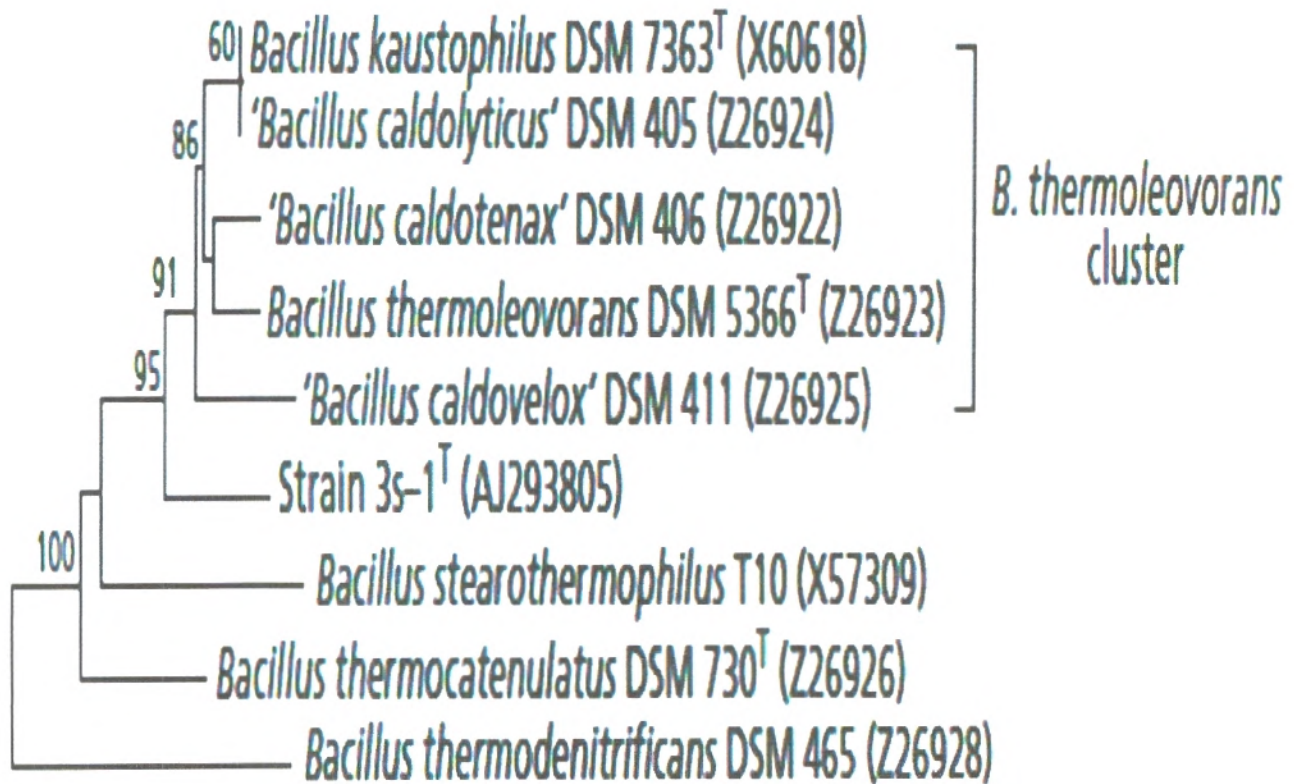
Le procédé est très rapide, cependant, quelques minutes par échantillon pour des colonies d'une plaque de Pétri, ainsi pour des normes peuvent être aisément examinées à côté de l'inconnu pour surmonter la dérive de la machine. Cette approche se prête au rapide et à la dactylographie hautement spécifique des bactéries comprenant les espèces de bacilles.

Une deuxième approche chimiotaxonomique de promesse pour l'identification courante des *Bacillus* est basée sur la composition en acide gras. Un système d'identification microbiennes utilisent l'analyse chromatographique en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras cellulaires est lancé sur le marché par Hewlett-Packard. La production d'un profil prend environ 60-90 mn (temps de préparation y compris qui peut être réduit quand des échantillons sont préparés dans les groupes) et le profil est comparé à une bibliothèque des profils pour l'espèce *Bacillus*. L'assortiment du profil avec un de la bibliothèque effectue une identification. Cette approche récemment a été avec succès employée pour l'identification des souches de *B. sphaericus* comprenant des types pathogènes pour les moustiques (**FRACHON et al., 1991**).

Les quelques rapports des sondes ADN et de la technologie relative pour l'identification et la dactylographie des bacilles se concentrent sur les groupes spécifiques d'importance environnementale ou biotechnologique particulière bien qu'une sonde pour *B. subtilis* basé sur

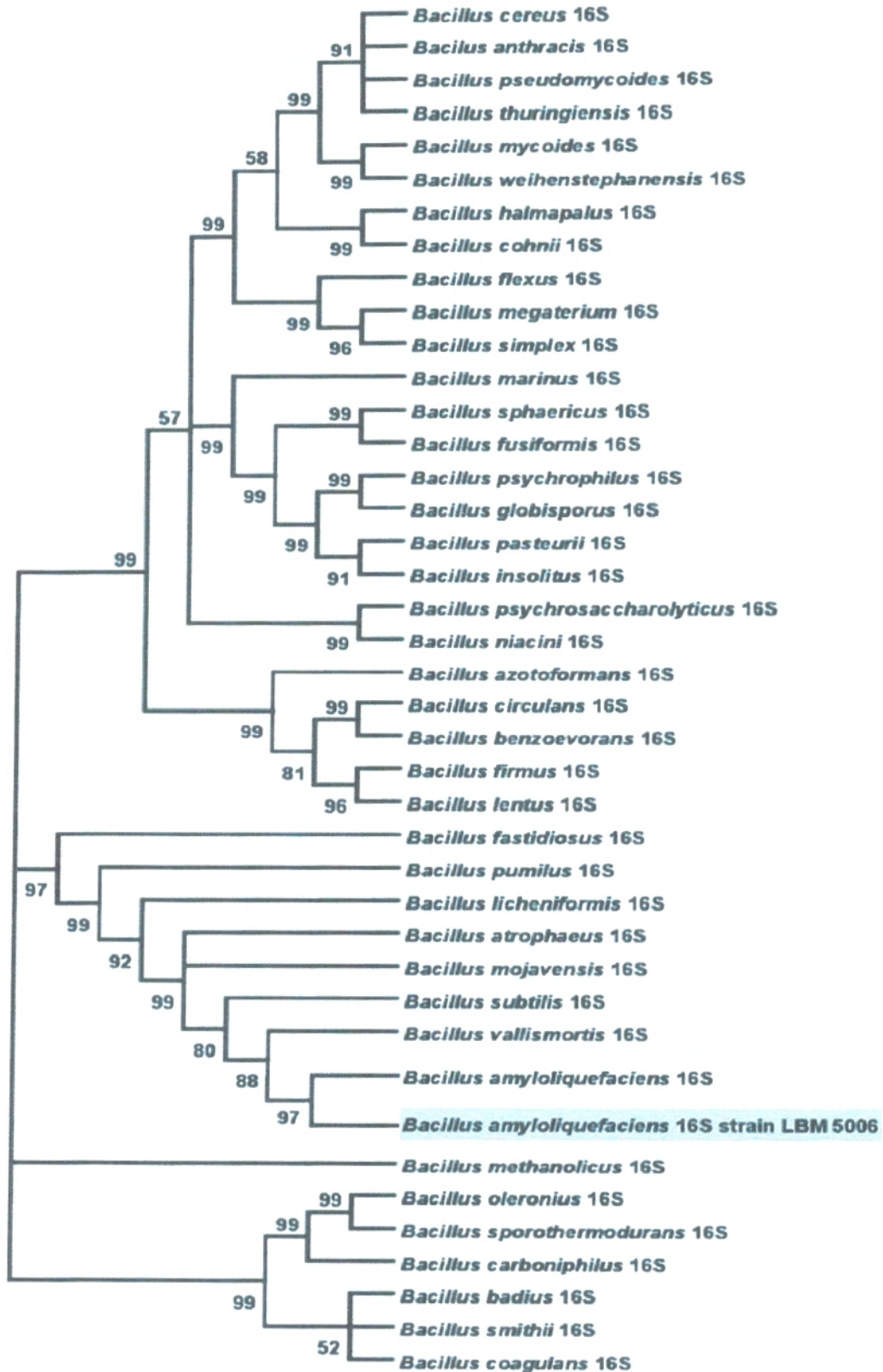
le 23S ARNr ait été préparée. Le *B. thuringiensis* du microbe pathogène d'insecte a suscité la plupart d'attention à cet égard. Les sondes d'oligonucléotide dirigées aux gènes de toxine ont été réussies pour la détection et l'identification de *B. thuringiensis*.

(Passé en revue en PRIEST et GRIGOROVA, 1990), et un procédé de dactylographie utilisant des produits de réaction en chaîne (PCR) de polymérase des gènes de toxine a été également rapporté (CAROZZI et al., 1991).



0.2%

❖ **Figure N°2 :** L'arbre phylogénétique montrant la position de la souche 3s-1T dans le rayonnement du bacille la barre du groupe 5. de 16S ARNr, 1 a impliqué la substitution de nucléotide par 500 nucléotides (Caccamo et al., 2012).



❖ **Figure N°3 :** Arbre phylogénétique basé sur des ordres de 16S ARNr des souches des *Bacillus* (Lisboa et al., 2006)

3.3-Les *Bacillus* dans la biotechnologie

L'exploitation du *Bacillus* dans l'ouest est plus récente. La fabrication des amylases et des protéases extracellulaires pour des applications industrielles a commencé tôt ce siècle, mais la production et l'utilisation significatives ont été retardées jusqu'à après les années 50 où les avantages d'inclure la protéase alcaline (subtilisine Carlsberg) du *Bacillus licheniformis* dans les détergents de lavage ont été réalisés.

Ceci a été suivi des développements en industrie de transformation d'amidon basée sur la α -amylase de *B. licheniformis* de., en particulier conversion d'amidon aux sirops de maïs à haut pourcentage de fructose comme remplacements de sucrose en nourritures et boissons (PRÊTRE, 1989).

Les *Bacillus* incluent beaucoup de bactéries versatiles et les agents de commande bactériens les plus efficaces pour différents parasites d'insecte. Le *Bacillus thuringiensis* a été isolé tôt ce siècle au Japon des vers à soie malades et en Allemagne du mammoth méditerranéen. Sa valeur comme commande d'agent pour des lépidoptères a été réalisé bientôt ensuite, mais commercialement seulement développé en 40 dernières années. Les *Bacillus* sont également des sources de nombreux antibiotiques, des amplificateurs de saveur tels que des nucléosides de purine, des agents tensio-actifs, et de divers autres produits (PRIEST, 1989). Ces biotechnologie attribue, ainsi que la sporulation et la germination, la biologie moléculaire dont fournit un système modèle pour la différenciation, a mené au grand intérêt pour ces bactéries et a eu comme conséquence *B. subtilis* devenant le système génétique le plus avancé disponible dans n'importe quelle bactérie gram positive (SONENSHEIN et al., 1993). Mais comme avec *Escherichia coli*, cette concentration sur une espèce a eu comme conséquence beaucoup d'autres étant ignorées et la grande diversité dans le genre *Bacillus* est rarement appréciée.

4. Screening des *Bacillus* thermophiles et hyperthermophiles

La revue bibliographique montre une diversité de sites d'études :

- Les sources thermales jordanien (**Fandi et al., 2012**).
- Les différents endroits de compartiment marin du Bengale (**krishna et al., 2011**).
- Les environnements aquatiques de la région d'Amazone (**Motta et al., 2004**).
- Les environnements tunisiens hypersaline (**Mahdhi et al., 2011**).
- Les sédiments anoxiques de hypersaline hauturier (**Sass et al., 2008**)

4.1-Les méthodes de screening pour l'identification des souches de *Bacillus*

Les techniques de prélèvements d'eau dans ses sites sont quasi identiques.

L'équipe de (**Fandi et al., 2012**) a prélevé les échantillons d'eau à partir de la marge au-dessous 15 cm de la surface de la source dans des tubes de verre thermique stériles de 50 ml recueillis à une température de 45°C à 60°C et des valeurs de pH : 7.2 à 7.8. Puis 5ml de chaque échantillon est cultivé en 50 ml de bouillon nutritif et incubé à 50°C pendant 48 h avec une agitation de 180 t/mn. Après repiquer les souches dans des boîtes d'agar nutritif par la méthode des stries et incubé sur les mêmes conditions. Après elles ont été purifiées.

L'équipe (**krishna et al., 2011**) a prélevé les échantillons d'eau aux profondeurs de 3-20 m. Les échantillons sont acheminés au laboratoire en état aseptique. Les souches a été préparées dans l'eau saline et en faisant des dilutions périodiques par la méthode de plaque. Les plaques ont été préparées et inoculées avec des souches par une strie simple d'inoculum au centre du la boîte de petri. Pour l'identification des souches et l'attribution au genre *Bacillus* sont étudiés les caractères morphologiques, culturels et physiologiques et biochimiques sur la base du manuel de Bergey de la Bactériologie.

L'équipe (**Mahdhi et al., 2011**) a prélevé les échantillons d'eau et les a enrichi dans un milieu (NBSW) 3.4% de salinité et pH 7.99. L'isolement a été effectué sur Gelose nutritive. Et l'incubation a été faite à 37°C pendant 24 h. et pour finir, l'identification a été réalisée sur la base des caractéristiques morphologiques, culturels et physiologiques standard ainsi que le système des plaques Api 20 E.

L'équipe (Motta et al., 2004) a prélevé les échantillons d'eau à 3°C et 60°C. Les micro-organismes ont été maintenues en bouillon de BHI (Difco, Detroit, Etats-Unis) complété par 20% du glycérol congelées à -21 °C. Les souches sont repiquées deux fois pour la purification avant d'être utilisées.

4.2-Les méthodes de des activités antimicrobiennes

Concernant les techniques de criblage des activités antimicrobiennes, Plusieurs méthodes ont été développées :

4.2.1- Screening primaire

Ce screening peut être réalisé par plusieurs techniques sur des milieux gélosé : technique des cylindre d'agar, technique des stries, et des puits.

La technique des cylindres d'agar consiste à ensemercer la surface de la gélose du microorganisme d'intérêt et incubé pendant quelques jours, des cylindre de gélose sont prélevés et sont déposés à la surface des boîtes ensemencées par germes-test. Placés deux heures à 4°C pour permettre la diffusion des substances actives, les boîtes sont reincubées. L'observation d'une zone d'inhibition autour des cylindres indique la présence de l'effet inhibiteur (Eccleston et al., 2008).

L'équipe (krishna et al., 2011) ; L'activité antimicrobienne a été déterminée par la méthode des puits d'agar dans des plaques et par la méthode modifiée de croix-strie. Les souches de *Bacillus subtilis* ont été inoculées en bouillon nutritif et incubées à 37°C pour 24 h. après elle a été séparée les cellules par centrifugation à 5000 t/mn et le surnageant a été employé pour examiner l'efficacité antimicrobienne.

4.2.2- Screening secondaire

Ce screening seulement pour les microorganismes présentant une activité inhibitrice, par des cultures liquides (filtrat ou surnageant) suit habituellement le screening primaire, il comprend plusieurs techniques : technique des disques en papier, technique des puits, la concentration minimale inhibitrice

L'équipe (**Fandi et al., 2012**) ; Les souches microbiens obtenus à partir des sources thermales ont été cultivés dans des flacons contenant le milieu de fermentation et incubé pendant 3-5 jours à 55°C. Après Les extraits bruts ont été obtenus par l'extraction par solvants organique des bouillons de culture. Les extraits de fermentation ont été analysés par la méthode de HPLC-MS et la spectroscopie RMN qui ont été exécutées pour tracer le nombre de métabolites secondaires produits dans de diverses conditions de croissance.

L'équipe (**Motta et al., 2004**) ; Les bactéries ont été développées dans des flacons contenant le bouillon de BHI et incubés pendant 48 h $31 \pm 1^\circ\text{C}$. Après la croissance, les milieux de culture ont été centrifugés à 10.000 g pendant 15 mn, et les surnageant a été filtrés à l'aide de membrane de 0.22 μm . Pour évaluer l'activité antimicrobienne des filtrats, elle a utilisé la méthode des disques de papier. Les plaques ont été incubées pour 24 h à la température optimale pour les microorganismes testés. Après elle a été mesuré les zones d'inhibition autour des disques.

L'équipe (**Mahdhi et al., 2011**) a été testée l'activité antimicrobienne par la méthode de plaques des puis d'agar ; les souches de *Bacillus* a été inoculée et incubé à 37 °C pendant 24 h après elle a été mesurée la densité optique des souches par nanomètre.

- Il ya d'autres méthodes de dépistage se servent du screening chimique et physiques. L'étude de mutation par des méthodes physiques (rayonnement UV) et chimiques d'utilisation de la mutation (NTG).

*MATÉRIEL ET
MÉTHODES*

1-Description de la source thermique D'bagh (Guelma)

Les échantillons ont été recueillis à partir d'une source thermique terrestre (Hammam D'bagh ou Meskhoutine), elle se situe à 20 kilomètres de la wilaya de Guelma, au nord-est de l'Algérie (70° 250' est, 36° 270' du nord), à une altitude de 320 M. Cette source comprend des griffons qui sont les plus chauds en Algérie, atteignant jusqu'à 98°C au point d'émergence de l'eau.



Figure 4 : Localisation de la source thermale étudiée sur la carte (Source : Google Earth)

2- Echantillonnage

Les échantillons d'eaux ont été prélevés durant le mois mars 2013 dans des flacons de verre stériles de 250 ml à l'aide d'un support à partir de «Griffon D ».

Les mesures de température et de pH sont faites *in situ* par un thermomètre à immersion totale avec mercure et les bandelettes de pH (97°C, entre 6.5-7.4 respectivement). Les échantillons ont été rassemblés à une profondeur entre 15-20 cm et ont été transportés au laboratoire à une température ambiante.

La partie expérimentale a été effectuée au niveau du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAAB), université Tlemcen.

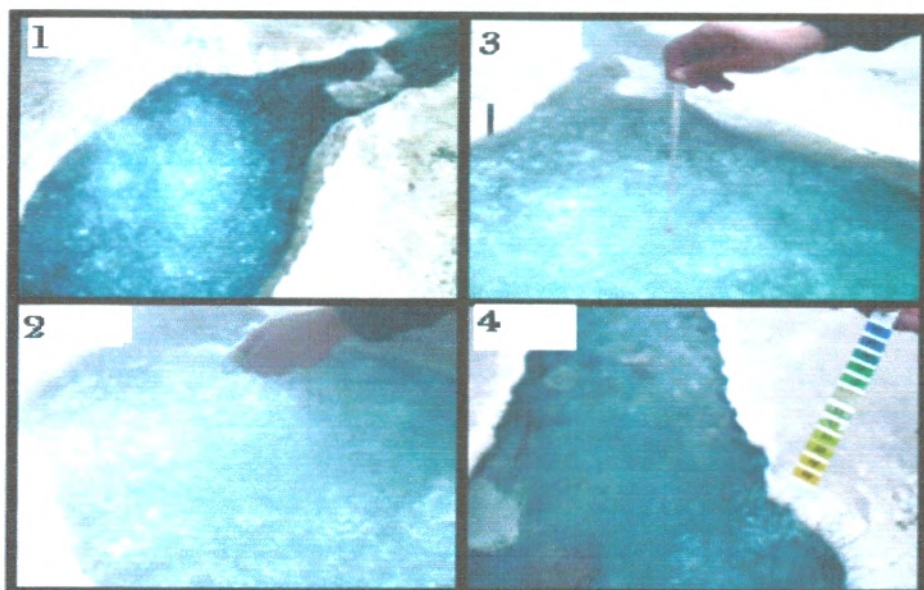


Figure5 : La source hydrothermale

1- la source d'eau «Griffon D », 2- le prélèvement,
3- mesure de la température. 4- mesure de pH

3- Pré-screening des *bacillus thermophiles*

Le but de cette étape de sélectionner les bactéries à Gram +, bâtonnets, capable de forme des spores selon le protocole proposé par **Logan et al. (2009)** pour la description de nouveaux taxons dans l'ordre des *Bacillales*.

3.1- Isolement

1ml d'échantillon d'eau a été mis dans 9ml de bouillon nutritif (BN), ensuite incubé à 65°C jusqu'à l'apparition d'un trouble (72 à 96 heures). Après, des passages successifs ont été effectués entre milieu liquide : bouillon nutritive (BN) à 65°C et milieu solide gélose nutritive (GN) à 55°C afin de purifier la culture.

3.2-Purification

La purification des isolats criblés a été basée sur les caractères cultureux et morphologiques

➤ **L'observation microscopique** à l'aide d'un microscope photonique.

- Observation à l'état frais : qui permet d'observer les cellules vivantes ainsi que leur mobilité, la présence des spores et la forme des souches.
- Coloration au bleu de méthylène, pendant 5 minutes, des cultures âgées afin de mettre en évidence les endospores (**Harley et Prescott, 2002**).

- Coloration de Gram : Décrite par **Gram (1884)**, elle permet de diviser les bactéries en deux groupes (Bactéries à Gram positif et à Gram négatif). En plus, elle permet de préciser la morphologie et le mode de regroupement des cellules.
- **L'aspect macroscopique** des colonies (forme, pigmentation, taille, etc.) est déterminé après croissance sur milieu solide (GN) après une incubation de 24 à 96 heures.

4- conservation des isolats :

Les souches pures présentant des aspects différents ont été conservées sur gélose nutritive inclinée à 4°C pour une durée de trois mois et sur des tubes eppendorff contenant du BN additionné de 15%(v/v) de glycérol stérile à 0°C pour une conservation à long terme

5- Identification phénotypique des isolats :

5.1- Caractères microscopiques et macroscopiques

Ces caractères ont été déterminés dans l'étape de la purification, et ont été choisis les bactéries à Gram +, bâtonnets, capable de former des spores.

5.2- Caractérisation biochimique

Sur le plan biochimique, la caractérisation des souches a été réalisée par l'utilisation du système api 20^E (**Logan et Berkeley, 1984**), et d'autres techniques de la microbiologie classique pour la recherche de la catalase, l'Amylase, la Lécithinase, la dégradation de la caséine, l'hydrolyse du tween 80, le Mannitol mobilité et le type respiratoire.

5.2.1- Test de Catalase

Il s'agit de la recherche de l'enzyme responsable de l'élimination du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂); la catalase. Son principe consiste à mettre en contact une colonie de l'isolat en présence d'eau oxygénée. Une effervescence due à un dégagement gazeux traduit la présence de cette enzyme (**Joffin et Leyral, 2006**).

5.2.2- Test Mannitol-Mobilité

La mobilité des souches ainsi que la fermentation du mannitol sont étudiées sur le milieu semi-solide Mannitol-Mobilité. La mobilité de l'isolat est interprétée par un envahissement du

milieu à partir de la pique d'inoculation et la fermentation du mannitol est traduite par un virage au jaune du milieu de culture (**Harley et Prescott, 2002**).

5.2.3- Test de type respiratoire

La mise en évidence de ce test a été effectuée selon les recommandations de **Guiraud (1998)**. Dans des tubes ont été coulé le milieu viande foie (VF). La gélose est régénérée par chauffage au bain marie bouillant pendant 30 minutes. L'ensemencement des souches a été réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur plongée au fond, puis remontée en décrivant une spire, de façon à ensemer uniformément le milieu sur toute la hauteur. Après refroidissement, une incubation à 55 °C pendant 24 à 72 heures a été effectuée.

5.2.4- Hydrolyse de l'amidon

Ce test est réalisé sur gélose à amidon (**voir annexe**). L'ensemencement des souches a été faite en une seule strie. Les observations sont effectuées après 24 heures d'incubation à 55°C après recouvrir la culture par une solution de Lugol.

L'hydrolyse est mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. A l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun (**De Vos et al., 2009**).

5.2.5- Test de la lécithinase

Les souches sont ensemencées en une seule strie dans les boîtes Pétri contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile (egg-yolk agar ou Gélose à l'œuf) (**voir annexe**). Après incubation à 55°C pendant 24 heures à 72 heures. l'apparition de zone claire autour de la culture prouve que la souche possède la lécithinase (**De VOS et al., 2009**).

5.2.6- Hydrolyse de la caséine

L'hydrolyse de la caséine est étudiée sur milieu gélose contenant 5% de lait écrémé (**voir annexe**). Les souches sont ensemencées en une seule strie, ensuite incubées à 55°C pendant 24 heures. L'observation d'une zone claire autour de la culture témoigne de l'hydrolyse de la caséine. (**De VOS et al., 2009**)

5.2.7- Hydrolyse des Tween 80

Sur milieu à base de Tween 80(**voir annexe**). Les souches sont ensemencées en une seule strie ensuite incubées pendant 24 à 72 heures à 55°C.

Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une zone opaque autour des colonies productrices de lipases (**Sierra, 1957**).

5.2.8- Tests de la galerie API 20E

La galerie Api 20^E est un système simplifié et standardisé, elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés permettant d'effectuer 20 tests biochimiques (**voir annexe**).

À partir d'une culture de 24 heures sur milieu GN des suspensions bactériennes d'une opacité de 0,5 Mc Ferland ont été préparées dans l'API medium. Après incubation 24 heures sous atmosphère humide à 55°C, les réactions se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. L'interprétation des résultats est faite en se référant au catalogue joint avec la plaque (**voir annexe**).

6- Activité antimicrobienne des souches isolées

La mise en évidence de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode des cylindres d'Agar, et technique des puits. Ces activités a été testée vis-à-vis de bactéries tests provenant de l'ensemble de ces souches de références est fourni par les équipes « Sécurité microbienne des aliments », « Substances naturelles antimicrobiennes » et « Hygiène hospitalière » et « Les extrêmophiles » du laboratoire **L.A.M.A.A.B.E.** - Tlemcen.

- **Inoculum des souches de référence**

Les germes test utilisés pour la mise en évidence du pouvoir antimicrobien de nos souches sont répertoriés dans le Tableau. Leur culture a été faite sur leurs milieux sélectifs pendant 18 à 24h. Ensuite des suspensions ont été préparées dont leur densité optique est standardisée entre 0,08 et 0,1 à une longueur d'onde $\lambda = 620$ nm pour les bactéries et entre 0,12 et 0,15 à une longueur d'onde $\lambda = 530$ nm pour la levure *Candida albicans* (turbidité équivalente à 0,5 McFarland).

Tableau 2: Germes test de référence utilisés

Germes tests	Références	Germes tests	Références
Gram positif		Gram négatifs	
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC11778	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC70603
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853
Levure			
<i>Candida albicans</i>		ATCC 10231	

6.1- Technique des cylindres d'Agar : (Eccleston et *al.*, 2008 ; Radhika et *al.*, 2011)

Dans cette méthode, les souches bactériennes sont ensemencées en stries serrées à la surface de la gélose (GN), coulée en boîtes de Pétri. Après incubation à 55°C pendant sept jours, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre ont été prélevés à l'aide d'une pipette pasteur stérile.

Les cylindres d'Agar sont ensuite déposés à la surface du milieu Mueller Hinton et Sabouraud préalablement ensemencés par écouvillonnage selon la technique de la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) avec les germes tests. Les boîtes de Pétri portant les cylindres d'Agar sont placées à 4 °C pendant quatre heures pour permettre une pré diffusion des substances bioactives élaborées par nos souches, puis incubées pendant 24 heures à 37 °C pour les bactéries et 25°C pour *Candida albicans*.

6-2- Technique des puits : (Chen et *al.*, 2010)

Après ensemencement des souches sur le milieu BN, et incubation pendant 72h à 55°C, le milieu est centrifugé à 6000 t/min pendant 30 minutes. A l'aide d'une pipette pasteur stérile, des puits de 6mmde diamètre sont creusés sur le milieu Muller Hinton et Sabouraud préalablement ensemencés par les germes test par écouvillon selon la technique de NCCLS.50 microlitres du surnageant des bactéries étudiées sont déposés dans chaque puits. Les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37 °C pour les bactéries et 25°C pour *Candida albicans*. Les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1- Isolement et purification des isolats

Après incubation de 72 à 96 heures à 65°C des tubes contenant du bouillon nutritif (BN) inoculé par les échantillons d'eau et l'apparition du trouble, un ensemencement est réalisé sur gélose nutritive.

Plusieurs colonies qui sont apparues après 4 à 7 jours d'incubation sur gélose nutritif (GN) à 55°C présentant des aspects microscopiques et macroscopiques différents, et après la purification, sept isolats (LMB3701, LMB3702, LMB3703, LMB3704, LMB3705, LMB3706, LMB3707) qui ont une forme bâtonnet, Gram positif et capable de former des endospores, sont sélectionnées pour l'identification.

2- Identification phénotypique des isolats

2.1- les caractères microscopiques et macroscopiques des isolats

Tous les souches sélectionnées sont des bactéries à des aspects différents capables de pousser à 65°C pendant 24 à 48 h sur BN (voir Tableau N°3 et les figures 6-7).

Tableau N°3 : Aspects macroscopique et microscopique des souches sélectionnées

		Aspects microscopique	Aspects macroscopique
Souches	LMB3701	Grand bâtonnet, mobile à gram positif, aux extrémités arrondies, et des spores terminales.	Colonies beige, avec un point au centre et des bords irréguliers
	LMB3702	Petits bâtonnet, mobile à gram positif, aux extrémités arrondies, et des spores terminales.	Colonies beige, visqueuse, opaque, à bords réguliers.
	LMB3703	longs bâtonnet, mobile à gram positif, aux extrémités arrondies, et des spores terminales.	Colonies crème, visqueuse, avec un centre opaque et des bords claires.
	LMB3704	Petits bâtonnet incurvées, mobile à gram positif, aux extrémités arrondies, et des spores terminales.	Colonies beige claire, visqueuse
	LMB3705	Grand bâtonnet allongés, mobile à gram positif, aux extrémités arrondies, et des spores sub-terminales.	Colonies visqueuse, translucides à bords réguliers.
	LMB3706	Petits bâtonnet, mobile à gram positif, aux extrémités arrondies, et des spores sub-terminales.	Colonies beige-crème à bords dentés et un centre jaune.
	LMB3707	Petits bâtonnet, mobile à gram aux extrémités arrondies et des spores terminales.	Grande colonies beige à bords dentés. positif, aux extrémités arrondies

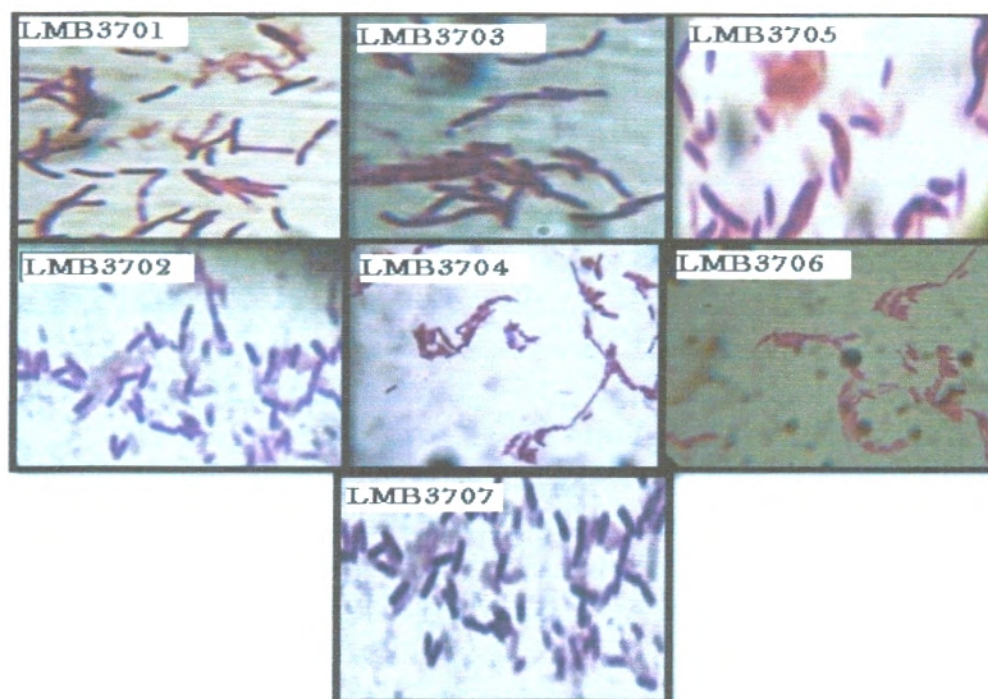


Figure N°6 : Aspects microscopique des souches sélectionnées

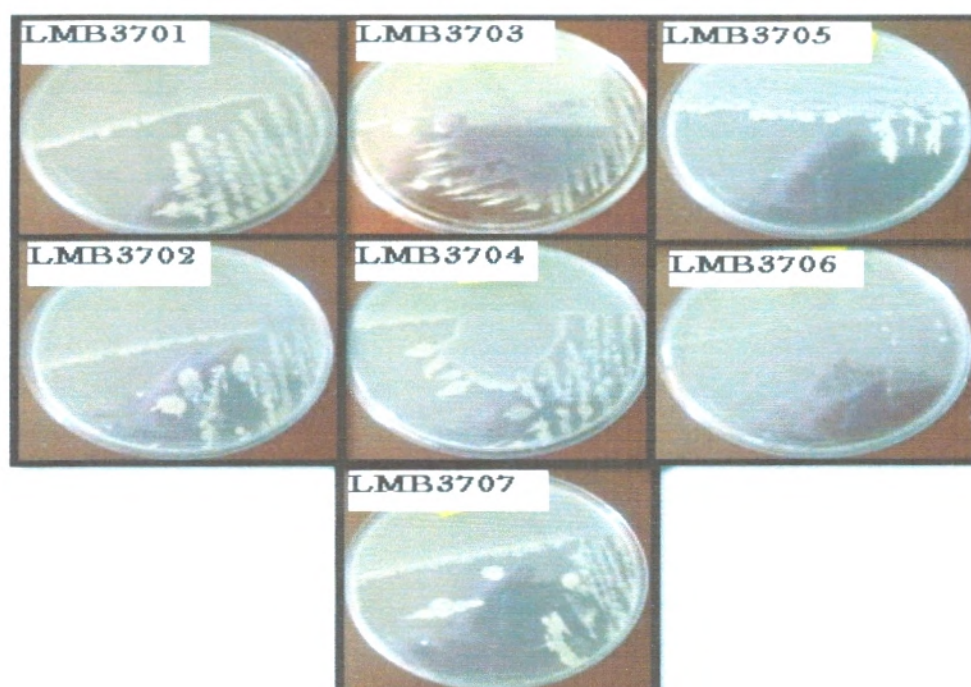


Figure N°7 : Aspects macroscopique des souches sélectionnées

2.2- Identification biochimiques des isolats :

- ✓ Les tests biochimiques sont présentés dans le tableau N°4 :

Tableau N°4 : résultats des tests biochimiques

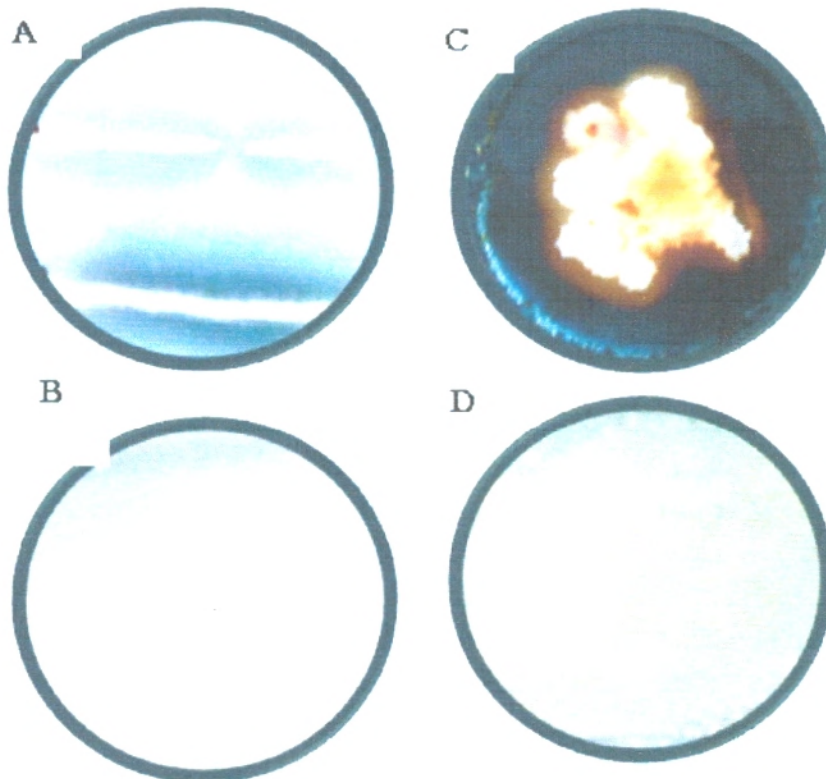
Tests biochimiques		LMB3701	LMB3702	LMB3703	LMB3704	LMB3705	LMB3706	LMB3707
	Catalase	+	+	+	+	+	+	+
	Mobilité	+	+	+	+	+	-	+
	Le type respiratoire	A	A	AF	A	A	AF	AF
	Dégradation de mannitol	+	+	+	+	-	+	+
	Dégradation de l'amidon	+	+	+	+	+	+	+
	Lécithinase	+	+	+	+	-	+	+
	Dégradation de la caséine	+	+	+	+	-	-	+
	Dégradation de tween 80	-	+	-	-	+	+	-

*A : aérobie *AF : aéro-anaérobie facultatif. + : résultat positif - : résultat négatif

2.1- Activités enzymatiques

Les activités amylolytique, protéolytique, lipolytique ont été mises en évidence en utilisant les milieux suivant : gélose à amidon, gélose à émulsion d'œuf, gélose au lait, et gélose au Tween 80. Les résultats sont mentionnés dans le tableau n 4 :

Les souches sont capables d'hydrolyser l'amidon, la lécithine, et la caséine à l'exception de la souche LMB3705 où lécithinase n'été pas observée, et les souches LMB3705, LMB3706 où la caséine n'été pas dégradée, et les souches LMB3702, LMB3705 et LMB3706 qui étaient incapables de dégrader le tween 80 (voir la figure N°6).



La figure N°6 : Activités enzymatiques

A- Dégradation de la caséine B- Dégradation de tween 80

C- Dégradation de l'amidon D- Dégradation lécithine

2.2- Résultats de la plaque API 20^E

✓ Les autres tests biochimiques ont été réalisés en utilisant la plaque **API 20 E**, les résultats sont mentionnés dans le tableau N°5.

Tableau N°5 : résultats de la plaque API 20^E

Tests du système Api 20^E

Souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMI	ARA
LMB3701	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMB3702	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMB3703	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
LMB3704	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
LMB3705	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMB3706	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMB3707	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-

+ : résultat positif - : résultat négatif

D'après les données ainsi obtenues par le système api 20^E, nous pouvons déduire les caractéristiques suivantes pour les souches :

✓ Ornithine Décarboxylase, Uréase, Tryptophane Désaminase, la production d'**H₂S**, d'Indole et l'acétoïne ont été absentes chez toutes les souches, mais pas chez la souche LMB3704 pour LDC, la souche LMB3701 et LMB3703 pour CIT, la souche LMB3702 et LMB3704 pour le TDA, et la souche LMB3704, LMB3704, LMB3706 pour le VP

✓ La β -galactosidase et l'Arginine dihydrolase sont présents chez toutes les souches sauf la souche LMB3705, LMB3706, et LMB3707 pour ADH

✓ Toutes les souches peut hydrolysant la Gélatine sauf la LMB3705 et LMB3706

✓ La plupart des souches ne fermentent pas les sucres, tandis que la souche LMB3703 se développe sur le glucose, l'Inositol, et le saccharose, ainsi que la souche LMB3704 capable de produire le Mannitol, l'Inositol, et le sorbitol, par contre la LMB3707 développe que sur le Mannitol. Et les utilisent comme source de carbone.

D'après les résultats qui nous avons obtenues, on peut dire que cette identification a une corrélation avec le genre *Bacillus*.

2.3- Résultats du Activité antimicrobienne des souches isolées

Le screening primaire de la production des activités antimicrobiennes extracellulaires ont été réalisés par la technique des cylindres d'agar et la technique des puits.

2.3.1- Technique des cylindres d'Agar

La technique des cylindres d'agar qui nous a permis de détecter l'effet inhibiteur de ces souches envers certains germes test utilisés.

Les souches ont été cultivées sur le GN et incubée à 55°C pendant 7jours. Des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre ont été prélevés, après 24h à 72h d'incubation les résultats ont été enregistrés et sont mentionnés dans le tableau N°6 et la figure N°7:

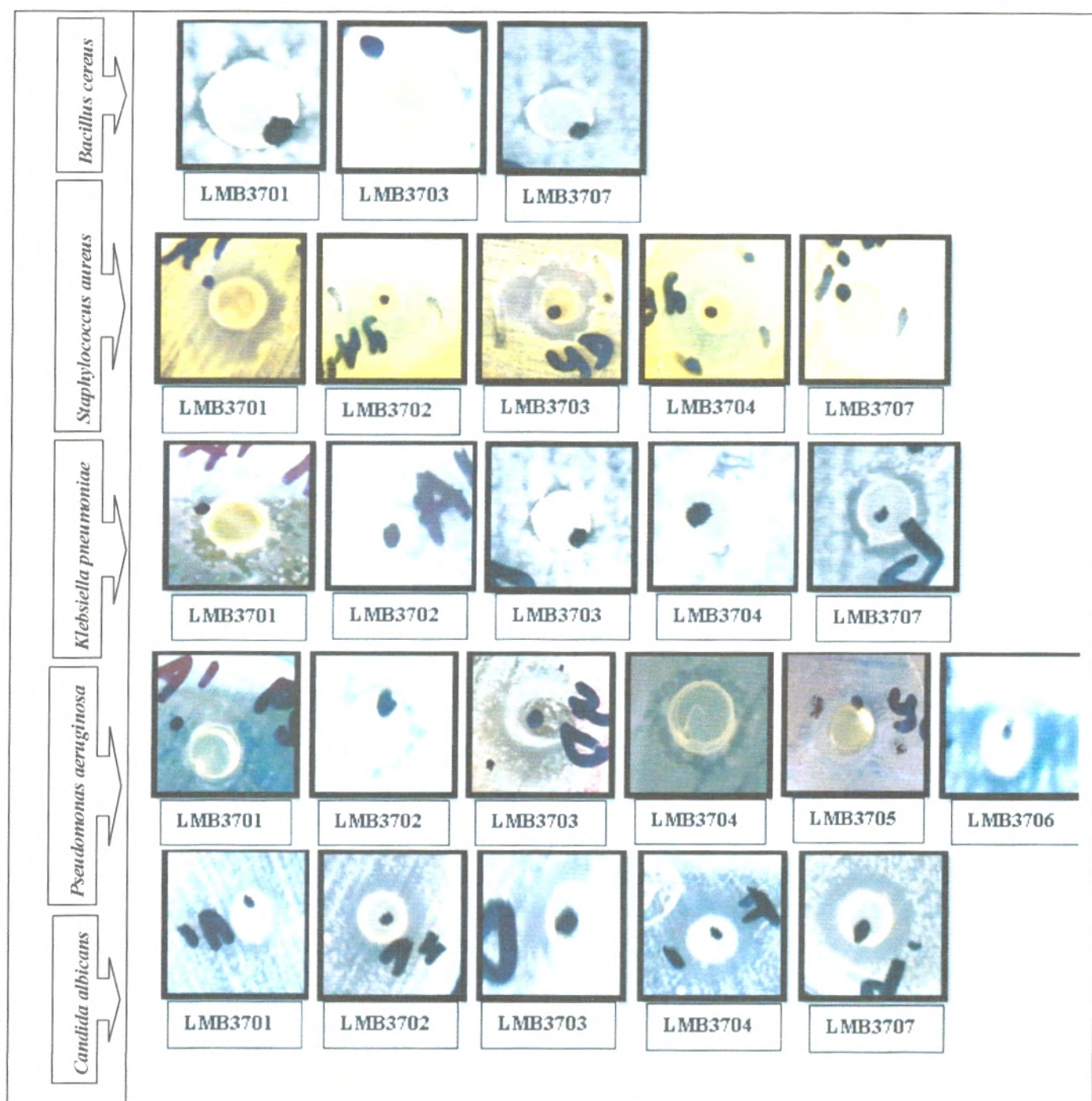


Figure N°7: les zones d'inhibition de la technique des cylindres d'agar

2.3.2- Technique des puits

Les quatre souches LMB3701, LMB3702, LMB3703, LMB3707 sont sélectionnées on raison de leur importance activité pour réalisée l'activité antimicrobienne par la technique des puits.

Et les résultats enregistrés sont mentionnés dans le tableau N°7 :

Tableau N°7 : Résultats du test de la technique des puits

	LMB3701	LMB3702	LMB3703	LMB3707
<i>Bacillus cereus</i>	7	8	7	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	7	7	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	8	7	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	9	9	-
<i>Candida albicans</i>	8	8	-	6

Le diamètre on millimètre : mm

Les résultats de la technique des puits et très faible par rapport de la technique des cylindres d'agar, les zones sont très petites.

3. Discussion

Dans ce travail qui a consisté à faire un screening de bactéries thermophiles et hyperthermophiles appartenant au genre *Bacillus* à partir d'échantillons d'eau des sources hydrothermales de d'begh de la willaya de Guelma. Cette source comprend des griffons qui sont les plus chauds en Algérie, atteignant jusqu'à 98°C au point d'émergence de l'eau.

Les échantillons d'eaux ont été prélevés durant le mois avril 2013 à partir de «Griffon D», Les mesures de température et de pH sont faites *in situ*.

Le premier partie a été mené un pré-screening des bactéries thermophiles et hyperthermophiles, leur isolement ont été réalisées sur BN et GN sur la base de critères culturels et microscopique (colonies d'aspect distinct, bâtonnet à Gram positif capable de former des spores.

Sept souches ont été sélectionnées (LMB3701, LMB3702, LMB3703, LMB3704, LMB3705, LMB3706, LMB3707) à 65°C, se sont des bactéries aérobies ou aéro-anaérobie facultative en forme des bâtonnets à Gram positif capable de former des spores, Ces caractéristiques appartiennent au groupe de *Bacillus* selon la classification numérique de (Priest *et al* 1988). Ces isolats poussent à des températures de 65°C et à 55°C, ces le cas les isolats appartiennent à des bactéries thermophiles, ont pousse de façon optimale à des températures allant jusqu'à 50°C, et elles ont une plage de croissance de 45 à 70°C (Madigan *et al.*, 2006). On peut aussi qualifier de thermophiles extrême en suivant la classification établie par Stetter (1996).

Les sept souches pures présentant des aspects différents ont été conservées sur gélose nutritive inclinée à 4°C pour une durée de trois mois et sur des tubes eppendorff contenant du BN additionné de 15%(v/v) de glycérol stérile à 0°C pour une conservation à long terme.

Concernant la deuxième étape c'est l'identification phénotypique des souches :

Trois étapes ont été suivies : (voir tableau 3,4 et 5)

- Etude des caractéristiques morphologiques.
- Etude des caractéristiques culturelles.
- Etude des caractéristiques biochimiques.

Ces résultats restent hypothétiques du fait de la non réalisation de la cinétique de croissance en fonction de la température.

Les souches sélectionnées sont des bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatives forment des endospores terminal et sub-terminal ; c'est le cas de la plupart des isolats bactériens aérobies et anaérobies facultatifs thermophiles (Dinsdale *et al.*, 2011 ; Nazina *et al.*, 2001).

La plupart des isolats étudiés possèdent une activité protéolytique, amylolytique ces le cas des bactéries thermophiles qui sont capables d'hydrolyser l'amidon et la caséine à des températures élevées selon (Yakhlef et Darbouche, 2012).

Et l'activité lipolytique n'est pas présente chez toutes les souches. Et selon les travaux de (Lelie *et al.*, 2005) le tween 80 a eu un effet inhibiteur sur l'activité de lipase. Et que la stabilité de lipase en présence des dissolvants organiques, comme dans les PHs acides et alcalins et à températures élevées lui fait un bon candidat pour son application dans la biocatalyse non aqueux.

Pour les autres tests biochimiques nous avons utilisé la plaque API 20^E.

Les études réalisées ont montré que la meilleure reproductibilité des tests pourrait être réalisée avec des plaques **API** qu'avec les tests classiques surtout pour la taxonomie du genre *Bacillus*. De plus, ces galeries se sont révélées utiles dans la caractérisation de plusieurs nouvelles espèces aérobies formant des endospores (De VOS *et al.*, 2009) .

Ce système a révélé que les souches ne fermentent pas les sucres. Par contre souche *Bacillus* 3s-1T thermophile d'un milieu marin hydrothermal qui a étudié par (Caccamo *et al.*, 2012), et les utilisent la majorité des sucres comme source de carbone.

D'après les résultats qui nous avons obtenu, et la littérature nous pouvons conclure que l'identification à une corrélation avec le genre *Bacillus*.

La troisième partie de ce travail consiste une étude de pré-caractérisation des activités antimicrobiennes ont été utilisées deux techniques de screening la technique des cylindres d'agar et la technique des puits.

En premier lieu l'activité antimicrobienne par la technique des cylindres d'agar, la plupart des souches donne des zones inhibition antibactériennes et antifongiques contre les bactéries à Gram positif, Gram négatif, et la levure *Candida albicans*. ces résultats concordent avec la plupart des études consacrées à la mise en évidence des activités antimicrobiennes des espèces extrêmophiles (Gebhardt et al., 2002 ; Ben Maachia et al., 20011 ; Kamat et al., 2011) et la meilleures activité présentes vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* où les diamètres étaient de 17et 20 mm.

Concernant la deuxième activité antimicrobienne par la technique des puits, les souches ont été un pouvoir inhibiteur faible contre tous les germes tests. Ces résultat négatifs peut ont montré probablement dûs à la dilution des activités dans le surnageant.

Ceci inclure ce rien les résultats très prometteurs obtenus lors du screening primaire.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

Les extrémophiles sont des microorganismes qui possèdent des possibilités d'applications dans plusieurs domaines, incluant l'agriculture, l'industrie, la pétrochimie et la bioremédiation des sols. Les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles sont des producteurs très connus des enzymes thermostables et les produits antimicrobiens et les composés bioactifs qui ont une importance dans les applications biotechnologiques.

Les espèces *Bacillus* sont largement identifiées comme source riche des composés antimicrobiens avec un certain nombre d'anti composés microbienness. Mais les souches des *Bacillus* thermophiles et hyperthermophiles doivent être exploitées encore correctement pour les composés antimicrobiens originaux et stables. Par conséquent, ces souches ont été écaillées vers le haut et soumises pour davantage de purification des compositions actives biologiques.

Dans étude bibliographique vise à décrire les différentes techniques de screening citées dans la littérature pour l'isolement des souches de *Bacillus* thermophiles et hyperthermophiles.

Les résultats de cette revue bibliographique indiquent que le potentiel de ces micro-organismes est très important, ils sont la source de beaucoup de métabolites.

La biodiversité à un impact pour la génomique fonctionnelle, et la recherche de nouveaux composés. Elle est un enjeu économique qui interpelle la recherche en biotechnologie.

L'objectif essentiel de ce travail -partie expérimentale- était d'une part de faire un pré-screening de bactéries extrémophiles en général et les *Bacillus* en particulier à partir d'une source hydrothermale de la willaya de guelma (D'bagh ou Meskhoutine), au nord-est de l'Algérie et leur identification jusqu'au genre d'autre part l'étude de quelques activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires et screening primaire des activités antimicrobiennes et débus de screening secondaire.

Concernant l'identification a été effectué sur sept souches qui sont sélectionnées d'après leurs aspects microscopique et macroscopique, se sont des aérobies ou aéro-anaérobies facultatifs, thermophiles, se développent à des températures de 65 et 55°C sur bouillons nutritif et 55°C sur gélose nutritive, la majorité de ces souches sont mobile, sous forme bâtonnet à Gram positif, avec des extrémités arrondies, possédant une catalase, dégradant le mannitol sauf une seul souche LMB3706.

Ces souches présentent un bagage enzymatique intéressant pour la détermination des activités protéolytiques, amylolytique et lipolytiques. Les résultats de ces activités ont montré que certains des souches possèdent des activités protéolytiques et amylolytiques, d'autre que trois souches pu hydrolyser le Tween 80.

Les tests de l'activité antimicrobienne ont montré que la plupart des souches possèdent un pouvoir inhibiteur contre les germes de test à Gram+, Gram- et *Candida albicans* et la meilleure présente contre *Staphylococcus aureus* où les diamètres étaient jusqu'aux 17 et 20 mm.

Comme perspectives nous souhaitons donc compléter l'identification et la classification de ces souches et leurs caractérisations fine activités antimicrobiennes contre tous les germes-test (la chromatographie sur colonne, HPLC, la spectroscopie Ultra-Violet et la spectroscopie de masse ... etc).

ANNEXES

Préparation des milieux de cultures utilisés**Milieux gélosés****Gélose nutritive**

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

pH =6,8-7,4

Gélose Mueller-Hinton

Infusion de viande de bœuf	300g
Hydrolysate de caseine	17.5g
Amidon	01.5g
Agar	17g
Eau distillée	1000ml

pH =7,4

Gélose viande-foie	
Extrait de viande	10 g
Peptone	20 g
Extrait de levure	10 g
Glucose	05 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,6

Gélose à amidon

Gélose nutritive	100ml
Amidon	01g

Gélose au lait

Préparation 1

Lait écrémé poudre05g

Eau distillée 50ml

Stérilisation par autoclave à 121°C / 20min

Préparation 2

Agar01g

Eau distillée 50ml

Stérilisation par autoclave à 121°C / 20min

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

Milieu pour mettre en évidence la dégradation du Tween 80

Peptone10g

Chlorure de sodium05g

Chlorure de calcium0.1g

Agar25g

Eau distillée 1000ml

10 gouttes du Tween 80 autoclavé sont ajoutées à 25 ml du milieu spécifique.....

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

Gélose nutritive 90 ml

Emulsion de jaune d'œuf 10 ml

Préparation de l'émulsion de jaune d'œuf

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

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

Milieux liquides

Bouillon nutritif

Peptone 10,0 g

Extrait de levure 5,0 g

Chlorure de sodium 5,0 g

Eau distillée 1000ml

pH = 7,2 ± 0,2.

➤ **Tableau de lecture de la galerieApi 20^E**

Tests	Composants actifs	Réactions /Enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl- β D-galactopyranoside	β -galactosidase (Ortho Nitro Phényl- β D-Galactopyranosidase)	incolore	jaune
ADH	L -arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange /rouge
LDC	L -lysine	Lysine Décarboxylase	Jaune	Orange /rouge
ODC	L-Ornithine	Ornithine Décarboxylase	Jaune	Orange /rouge
CIT	Trisodium citrate	Utilisation du Citrate	Vert pâle - jaune	Bleu-vert-bleu
H₂S	Sodium thiosulfate	Production d' H₂S	Incolore-grisâtre	Dépôt noir-fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange /rouge
TDA	L-tryptophane	Tryptophane Désaminase	TDA immédiat	
			Jaune	Marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	Production d'Indole	JAMES immédiat	
			Incolore-vert pâle – jaune	Rose
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoïne	VP1+VP2/10min	
			Incolore – rose pâle	Rose - rouge
GEL	Gélatine (origine bovine)	Hydrolyse (protéase) (Gélatine)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment
GLU	D-glucose	Fermentation -oxydation (Glucose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
MAN	D-mannitol	Fermentation -oxydation (Mannitol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
INO	Inositol	Fermentation -oxydation (Inositol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
SOR	D-sorbitol	Fermentation -oxydation (Sorbitol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
RHA	L-rhamnose	Fermentation -oxydation (Rhamnose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
SAC	D-saccharose	Fermentation -oxydation (Saccharose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
MEL	D-melibiose	Fermentation -oxydation (Melibiose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
AMY	Amygdaline	Fermentation -oxydation (Amygdaline)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
ARA	L-arabinose	Fermentation -oxydation (Arabinose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

Références bibliographique

- 1- **Adams M.W.W.** (1999) in: **Bustard M. T., Burgess J.G., Meeyoo. V., Wright P. C.** (2000). Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. J Chem Technol Biotechnol* 75:1095±1109.
- 2- **Alain K., Geslin C., Godfroy A., Prieur D.** (2010). Fiche_big2010_thermophiles.
- 3- **AMANN (R.I.), LUDWIG (W.) et SCHLEIFER (K.-H.)** (1995). – *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev.*, 59(1), p. 143-169.
- 4- **Baross J.A., Deming J.W.** (1996). **Juniper S.K., Martineu P., Alvinellids., sulphides.** (1995) in: **Bustard M. T., Burgess J.G., Meeyoo. V., Wright P. C.** (2000). Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. J Chem Technol Biotechnol* 75:1095±1109.
- 5- **Baross J.A., Holden J.F.** (1996) in: **Bustard M. T., Burgess J.G., Meeyoo. V., Wright P. C.** (2000). Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. J Chem Technol Biotechnol* 75:1095±1109.
- 6- **Beck P., Huber R.** (1997) in: **Bustard M. T., Burgess J.G., Meeyoo. V., Wright P. C.** (2000). Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. J Chem Technol Biotechnol* 75:1095±1109.
- 7- **Ben Maachia S., Errakhi R., Mathieu F., Chérif M. and Lebrihi A.** 2011. Identification and partial characterization of antifungal and antibacterial activities of two *Bacillus* sp. Strains isolated from salt soil in Tunisia. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 5(13) : 1599-1608.
- 8- **BERKELEY et al. (1984)** in : **PRIEST F.G.** (2008). Chapter 11. *Bacillus*. Livres of taxonomie. DOI: 10.1002/9783527620999.ch11.
- 9- **BROCK (T.D.) et FREEZE (H.).** (1969). – *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a non sporulating extreme thermophile .*J. Bacteriol.*, 98 p. 289-297.

- 10- Brock .T. D. (1986). Kelly R. M., Peeples T. L., Halio S. B., Rinker K. R., Duffaud G. D (1994) in: Fandi Khalid., Massadeh Muhanad., Laatsch Hartmut. (2012). LC-MS/MS Profiling-based Metabolite Screening of thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs. International Conference on Applied Chemistry and Pharmaceutical Sciences.**
- 11- Bustard M. T., Burgess J.G., Meeyoo. V., Wright P. C. (2000).** Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. J Chem Technol Biotechnol* 75:1095±1109.
- 12- Caccamo D., Gugliandolo C., Stackebrandt E., Teresa L. M. (2012).** *Bacillus vulcani* sp. nov., a novel thermophilic species isolated from a shallow marine hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- 13- CHIVIAN (D.) et al. (2008).** – *Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within earth.* *Science*, 322(5899), p. 275- 278.
- 14- CAROZZI et al. (1991) in : PRIEST F.G. (2008).** Chapter 11. *Bacillus*. Livres of taxonomie. DOI: 10.1002/9783527620999.ch11.
- 15- CAVICCHIOLI (R.) et al. (2002).** – *Low-temperature extremophiles and their applications.* *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13(3), p. 253-261.
- 16- Chen L., Wang G., Bu T., Zhang Y., Wang Y., Liu M., Lin X.2010.** Phylogenetic analysis and screening of antimicrobial and cytotoxic activities of moderately halophilic bacteria isolated from the Weihai Solar Saltern (China). *World J. Microbiol. Biotechnol.*,26:879–888.
- 17- CLAUS et al. (1986) in : PRIEST F.G. (2008).** Chapter 11. *Bacillus*. Livres of taxonomie. DOI: 10.1002/9783527620999.ch11.
- 18- Corre E., Prieur D. (2000).** Molecular microbial diversity of two externes environments: deep hydrothermal vents and oll reservoirs. [Note(s): [237 p.]] (bibl.: 883 refs.) (N°: 00 BRES 2053).
- 19- De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B. 2009.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., The *Firmicute*.Springer. New York. Volume Three. 63-67.

- 20- Dietrich J., Gueguen Y. (2002). Enzymes issues d'extrêmophiles. l'actualité chimique - août-septembre 2002.
- 21- . DINSDALE A.E., HALKET G., COOREVITS A., Van LANDSCHOOT A., BUSSE H.J., De VOS P., LOGAN N.A. (2011). Emended descriptions of *Geobacillus thermoleovorans* and *Geobacillus thermocatenuatus*. Int. J. of Syst. and Evo. Microbio., 61, 1802–1810.
- 22- Eccleston G. P., Brooks P. R., Kurtboke D. I. 2008. The occurrence of bioactive micromonosporae in aquatic habitats of the sunshine coast in Australia, *Marine Drugs*, 6, 243-261.
- 23- Fandi K., Massadeh M., Laatsch H. (2012). LC-MS/MS Profiling-based Metabolite Screening of thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs. International Conference on Applied Chemistry and Pharmaceutical Sciences.
- 24- Fiala G., Stetter KO. (1986) in: Bustard M. T., Burgess J.G., Meeyoo. V., Wright P. C. (2000). Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. J Chem Technol Biotechnol 75:1095±1109.
- 25- FRACHON et al. (1991) in : PRIEST F.G. (2008). Chapter 11. Bacillus. Livres of taxonomie. DOI: 10.1002/9783527620999.ch11.
- 26- Gebhardt K., Schimana J., Muller J., Fielder H. P., Kallenborn H. G., holzenkampfer M., Krastel P., Zeeck A., Vater J., Holtzel A., Schmid D. G., Rheinheimer J. and Dettner K. 2002. Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic *bacilli* isolated from arthropods. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 217: 199–205.
- 27- GOMRI M. A. (2012). Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermales terrestres de l'Est algérien. UNIVERSITE MENTOURI-CONSTANTINE Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (INATAA) Département de Biotechnologie alimentaire.
- 28- Gonzalez J.M., Masuchi Y., Robb F.T., Ammerman J.W., Maeder D.L., Yanagibayashi M., Tamaoka J., Kato C. (1998) in: Bustard M. T., Burgess J.G., Meeyoo. V., Wright P. C. (2000). Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. J Chem Technol Biotechnol 75:1095±1109.

- 29- Guezennec J.** (2004). Les bactéries des sources hydrothermales profondes a l'origine de nouvelles molécules bioactives ?. *VertigO - la revue électronique en sciences de l'environnement* [En ligne], Volume 5 Numéro 3.
- 30- Guiraud J. P.** 1998. Techniques d'analyses microbiologiques. *In: microbiologie alimentaire.* Dunod, paris. 168-333.
- 31- Harley J. P. et Prescott L. M.** 2002. Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edn. 449 p.
- 32- Hazem A., Al-Quadan F., Tahani K. Y.** (2009). Characterization of a Purified Thermostable Protease from Hyperthermophilic *Bacillus* Strain HUTBS71. *European Journal of Scientific Research* ISSN 1450-216X Vol.31 No.2, pp.280-288 © EuroJournals Publishing.
- 33- Horikoshi K., Yayanos A.A., Grant W.D.** (1998) **Karl W. & S., Baross J.A., Deming J.W.** (1995) in: **Bustard M. T., Burgess J.G., Meeyoo. V., Wright P. C.** (2000). Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. J Chem Technol Biotechnol* 75:1095±1109.
- 34- JOFFIN J.N., LEYRAL G.** (2006). Microbiologie technique, tome 1 : dictionnaire des techniques 4ème édition. 361P.
- 35- Kamat T. K., Kiran S. and Kerkar S.** 2011. Antimicrobial potential of *bacillus marismortui*, a salt pan isolate of Cavellosim, Goa, India. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, Vol. 2, Issue 3, 321-328.
- 36- Kato C., Inoue A., Horikoshi K.** (1996) in: **Bustard M. T., Burgess J.G., Meeyoo. V., Wright P. C.** (2000). Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. J Chem Technol Biotechnol* 75:1095±1109.
- 37- Kengen S.W.M.** (1996) in: **Bustard M. T., Burgess J.G., Meeyoo. V., Wright P. C.** (2000). Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. J Chem Technol Biotechnol* 75:1095±1109.
- 38- Krahe M., Antranikian G., Markl H.** (1996) in: **Bustard M. T., Burgess J.G., Meeyoo. V., Wright P. C.** (2000). Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. J Chem Technol Biotechnol* 75:1095±1109.

- 39- **Krishna E. R., Kumar P. Shamsheer., Kumar B. V.** (2011). Strain Improvement of Selected Strain *Bacillus subtilis* (MTCC No.10619) for Enhanced Production of Antimicrobial Metabolites. *J. Microbiol. Biotech. Res.*, 1 (3):32-38.
- 40- **Kwon E.Y., Cho Y. Y., Do G. M., Kim H. J., Jeon S. M., Park Y. B., Lee M. K., Min T. S., Choi M. S.** (2002) in: **Fandi K., Massadeh M., Laatsch H.** (2012). LC-MS/MS Profiling-based Metabolite Screening of thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs. *International Conference on Applied Chemistry and Pharmaceutical Sciences*.
- 41- **Lelie D., Citlali R.G, Gerardo V.A, Rosamar'ia O.R.** (2005). Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology* 37 (2005) 648–654.
- 42- **LENTZEN (G.) et SCHWARZ (T.).** (2006). – *Extremolytes : natural compounds from extremophiles for versatile applications*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72(4), p. 623-634.
- 43- **Lisboa P. M., Bonatto D., Bizani D., Henriques P. A. J., Brandelli A.** (2006). Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *INTERNATIONAL MICROBIOLOGY* 9:111-118.
- 44- **Madigan MT, Martino JM** (2006). *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed). Pearson. 136.
- 45- **MAHDHI. A., KAMOUN. F., BAKHROUF. A.** (2011). Inhibitory activity and adhesive ability of potential probiotic *Bacillus* species to confer protection for *Artemia* gnotobiotic culture against pathogenic *Vibrio* spp. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2011; 35(4): 227-233 © TÜBİTAK doi: 10.3906/vet-0912-199.
- 46- **Motta A. S.; Cladera O.F; Brandelli A.** (2004). Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the amazon basin. *Brazilian Journal of Microbiology* 35:307-310 ISSN 1517-8382.
- 47- **NAZINA T.N., TOUROVA T.P., POLTARAUS A.B., NOVIKOVA E.V., GRIGORYAN A.A., IVANOVA A.E., LYSENKO A.M., PETRUNYAKA V.V., OSIPOV G.A., BELYAEV S.S., IVANOV M.V.** (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G.kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int., J., Syst., Evol., Microbiol.*, 51:433-446.

- 48- Nicolaus B., panicoi Adriana., Mancat M. C., Lama L., Gambacortat A., Maugeri T., Gugliandolo C., Caccam D. (2000). A Thermophilic *Bacillus* Isolated From an Eolian Shallow Hydrothermal Vent, Able to Produce Exopolysaccharides. System. Appl. Microbiol. 23, 426-432 © Urban & Fischer Verlag.
- 49- Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M., Antranikian G. (1999) in: Bustard M. T., Burgess J.G., Meeyoo. V., Wright P. C. (2000). Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. J Chem Technol Biotechnol 75:1095±1109.
- 50- PRÊTRE. (1989) in : PRIEST F.G. (2008). Chapter 11. Bacillus. Livres of taxonomie. DOI: 10.1002/9783527620999.ch11.
- 51- PRIEST G.F., FERGUS G., GOODFELLOW M., TODD C. (1988). A Numerical Classification of the genus *Bacillus*. J. of general microbiol., 134:1847-1882.
- 52- PRIEST. (1989) in: PRIEST F.G. (2008). Chapter 11. Bacillus. Livres of taxonomie. DOI: 10.1002/9783527620999.ch11.
- 53- QUÉRELLOU J., GUÉZENNEC J. (2013). Biotechnologie des extrêmophile. 7200092269 - cerist // 193.194.76.5.
- 54- Radhika S., Bharathi S., Radhakrishnan M. and Alagurunathan R. 2011. Bioprospecting of Fresh Water *Actinobacteria*: Isolation, Antagonistic Potential and Characterization of Selected Isolates. *Journal of Pharmacy Research.*, 4(8), 2584-2586.
- 55- Raven N.D.H., Sharp R.J. (1997) in: Bustard M. T., Burgess J.G., Meeyoo. V., Wright P. C. (2000). Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. J Chem Technol Biotechnol 75:1095±1109.
- 56- Rinker K.D., Han C.J., Kelly R.M. (1999) in: Bustard M. T., Burgess J.G., Meeyoo. V., Wright P. C. (2000). Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. J Chem Technol Biotechnol 75:1095±1109.
- 57- ROUSSEL (E.G.) *et al.* (2008). – *Extending the subsea-floor biosphere*. Science, 320(5879), p. 1046.

- 58- **Sass A. M., McKew B.A., Sass H., Fichtel J., Timmis K. N., Genity T.J.M.c.** (2008). Diversity of *Bacillus*-like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments. *Saline Systems*, 4:8 doi: 10.1186/1746-1448-4-8.
- 59- **Sharp R., Raven N.** (1996) in: **Bustard M. T., Burgess J.G., Meeyoo. V., Wright P. C.** (2000). Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. J Chem Technol Biotechnol* 75:1095±1109.
- 60- **SIERRA G.A. (1957).** Simple method for the selection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*; 23:15-22.
- 61- **SIDDIQUI (K.S.) et CAVICCHIOLI (R.). (2006).** *Coldadapted enzymes*. *An. Rev. Biochem.*, 75(1), p. 403-433.
- 62- **SONENSHEIN et al. (1993) in : PRIEST F.G. (2008).** Chapter 11. *Bacillus*. *Livres of taxonomie*. DOI: 10.1002/9783527620999.ch11.
- 63- **Stetter. (2011) in: GOMRI M. A. (2012).** Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermales terrestres de l'Est algérien. UNIVERSITE MENTOURI-CONSTANTINE Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (INATAA) Département de Biotechnologie alimentaire.
- 64- **STETTER K.O. (1996).** Hyperthermophilic prokaryotes. *F.E.M.S. Microbiol., Rev.*, 18:149-158.
- 65- **Stetter K.O. (1996) in: Bustard M. T., Burgess J.G., Meeyoo. V., Wright P. C.** (2000). Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. J Chem Technol Biotechnol* 75:1095±1109.
- 66- **STETTER K.O. (1996) in: GOMRI M.A. (2012).** Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermales terrestres de l'Est algérien. UNIVERSITE MENTOURI-CONSTANTINE Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (INATAA) Département de Biotechnologie alimentaire.
- 67- **Takai K., Inoue A., Horikoshi K in: Bustard M. T., Burgess J.G., Meeyoo. V., Wright P. C. (2000).** Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. J Chem Technol Biotechnol* 75:1095±1109.

Résumé

Les extrêmophiles sont des micro-organismes qui se développent de manière optimale dans des conditions de milieux mortelles pour la quasi- totalité des autres espèces.

Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles des environnements chauds possèdent des capacités d'adaptations moléculaires intéressantes et constituent ainsi une importante source de molécules bioactives.

Objectif de cette étude consiste de cribler les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles en générale et les *Bacillus* en particulier à partir de la source thermique de Hammam D'bagh (Guelma), Pour cela Sept souches ont été isolées et ont été étudiées leurs identification phenotypique, activités hydrolytiques extracellulaires et la mise en évidence le pré-screening des activités antimicrobiennes.

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

Abstract

The extrêmophiles are micro-organisms which develop in an optimal way under conditions of mortals mediums for the near total of the other species.

The thermophilous micro-organisms and hyperthermophiles of the hot environments have capacities of interesting molecular adaptations and thus constitute an important source of bioactives molecules.

Objective of this study consists to sift the thermophilous micro-organisms and hyperthermophiles in general and *Bacillus* in particular starting from the thermal spring of Hammam Of bagh (Guelma), For that Seven stocks was isolated and was studied their phenotypical identification, extracellular hydrolytic activities and the description the pre-screening of the antimicrobic activities.

Key words: screening, *Bacillus*, extrêmophile, Intibacterial activity

ملخص

البكتيريا الغير العادية هي التي تنمو بكيفية هائلة تحت تأثير العوامل الصعبة بشكل شبه كامل كبقية الأصناف البكتيرية.

البكتيريا التارموفيلية و الهيرتارموفيلية التي تعيش في الأوساط الساخنة تملك القدرة عالية على التكيف مع الجزيئات و تكسب أيضا منبع هام يحتوي على جزيئات حيوية ناشطة.

الهدف من هذه الدراسة هو انتقاء البكتيريا التارموفيلية و الهيرتارموفيلية بشكل عام و الباسيلوس (*bacillus*) بشكل خاص التي استخرجت من المنبع الساخن لحمام دباغ (قالمة). ومن أجل هذا سبع سلالات بكتيرية تم اختيارها ودراسة خصائصها الظاهرية ونشاطها الإماهي خارج الخلايا وكذلك نشاطها ضد البكتيريا.

الكلمات المفتاحية

البحث ، *bacillus* ، الظروف الصعبة ، النشاط المضاد للمكروبات