



**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche**  
**scientifique**

Université ABOU BAKR BELKAID de Tlemcen  
Faculté des sciences de la nature et de la vie  
et des sciences de la terre et de l'univers  
Département de Biologie  
Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire,  
au Biomédical et à l'Environnement



## **Mémoire**

Présenté par  
**BENBEKHTI Meriem**

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Microbiologie et Contrôle de Qualité

## **Thème**

**Criblage d'enzymes d'intérêt biotechnologique à  
partir des bactéries extrêmophiles isolées de la  
grande sebkha d'Oran.**

Soutenu le **14 /07/ 2024**

Devant le jury composé de :

<b>Présidente</b>	KLOUCHE KHELIL Nihel Amina	Professeur à l'Université de Tlemcen-Algérie
<b>Encadrante</b>	NAS Fatima ep. RABEHI	M.A.B. Université de Tlemcen-Algérie
<b>Examinatrice</b>	MEZIANI Zahera ep. BELHACHEMI	M.A.B. Université de Tlemcen-Algérie

# Remerciements

Avant tout je remercie ALLAH, le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui nous aide et nous donne le courage de tout faire.

Ce travail est l'aboutissement d'un long chemin au cours duquel j'ai bénéficié de l'encouragement et du soutien de plusieurs personnes.

Je suis particulièrement reconnaissante aux membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail :

**Mme KLOUCHE KHELIL Nihel**, Professeur à l'Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen et chef de l'équipe « Bactéries extrêmophiles » du laboratoire LAMAABE qui a accepté de présider ce jury

**Mme MEZIANI Zahira**, M. A. B. à l'Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen qui a accepté d'examiner ce travail.

Je suis particulièrement honorée de bénéficier de vos remarques, chères enseignantes, et je tiens à vous assurer de ma grande estime et de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier plus particulièrement ma promotrice **Mme NAS Fatima, M. A. B.** à l'Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen d'avoir proposé ce sujet de mémoire et de m'avoir permis de mener à bien ce travail grâce à son soutien de chaque instant, sa générosité, ses conseils et sa gentillesse. J'ai eu vraiment un grand honneur de travailler sous sa direction.

J'adresse également mes remerciements à ma petite famille, mes chers amis, et collègues d'avoir cru en moi et de m'avoir boosté à finir ce travail.

Je n'oublierai jamais d'adresser ma parfaite gratitude et tendresse à ceux qui me sont les plus chers : **Mes parents**, sans leurs encouragements et leur soutien ce mémoire n'aurait jamais pu être réalisé.

## Dédicaces

Je dédie ce présent travail :

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin pour que je puisse arriver à ce stade

A mes très chers parents :

A ma mère HAYAT qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau

.Ni sacrifices, ni privatisations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de

l'avenir de ces enfants.

A mon cher papa KAMAL qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa

chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.

Que dieu vous procure santé, prospérité et bonheur...

A ma sœur ASMAA et mon frère AYOUB que dieu vous garde et vous protège que votre

chemin soit plein succès.

A toute ma famille

A mes chéries Nassima, Imene, Noudjoud pour leur aide et leur soutien que dieu vous

protège et vous préserve.

Pour terminer je tiens à remercier notre encadreur « Mme NAS Fatima » pour son aide et son

soutien durant toute l'année

## Table des matières

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

<b>Introduction générale .....</b>	<b>1</b>
<b>Synthèse bibliographique</b>	
<b>I- Les microorganismes extrémophiles.....</b>	<b>3</b>
I.1-Définition .....	3
I.2- Classification des microorganismes extrémophiles .....	3
I.2.1- Les microorganismes extrémophiles et la salinité .....	3
I.2.2- Les microorganismes et la température .....	4
I.2.3- Les microorganismes extrémophiles et le pH.....	5
<b>II-Les bactéries halophiles et halotolérantes.....</b>	<b>5</b>
II.1- Les biotopes naturels des bactéries halophiles et halotolérantes.....	5
II. 1. 1. Les sols salins.....	6
II. 1. 2. Les milieux salins aquatiques.....	6
II. 2. Les stratégies d'adaptation des bactéries halophiles et halotolérants.....	7
II. 2. 1. La stratégie d'adaptation par accumulation de KCL.....	7
II. 2. 2. La stratégie d'adaptation par production ou accumulation d'osmoprotecteurs.....	7
II. 3. Diversité phylogénétique des bactéries halophiles et halotolérantes.....	8
<b>III. Production des enzymes par les bactéries halophiles et halotolérantes.....</b>	<b>9</b>
III. 1. Définition des enzymes.....	9
III. 2. Les classes des enzymes.....	9
III. 3. Les hydrolases produites par les bactéries halophiles et halotolérantes et leurs applications biotechnologiques.....	10
III. 3. 1. Les amylases.....	11
III. 3. 2. Les protéases .....	11
III. 3. 3. Les lipases.....	11

III. 3. 4. Les cellulases.....	12
--------------------------------	----

## **Matériels et Méthodes**

<b>I. Origine des souches.....</b>	<b>13</b>
------------------------------------	-----------

I. 1. Revivification et vérification de la pureté des souches.....	13
--	----

I. 2. Présentation du site d'échantillonnage : la Grande Sebkha d'Oran.....	13
---	----

<b>II. Screening des activités enzymatiques extracellulaires des isolats.....</b>	<b>14</b>
---	-----------

II. 1. Screening sur milieu gélosé.....	14
---	----

II. 1. 2. Recherche de l'activité cellulosique.....	15
---	----

II. 1. 3. Recherche des activités protéasiques.....	15
---	----

II. 1. 3. 1. Hydrolyse de la caséine.....	15
---	----

II. 1. 3. 2. Hydrolyse de la gélatine.....	15
--	----

II. 1. 4. Recherche des activités estérasiques.....	15
---	----

II. 1. 4. 1. Hydrolyse du Tween 80.....	15
---	----

II. 1. 4. 2. Recherche de la lécithinase.....	15
---	----

II. 1. 5. Recherche de la lipase.....	15
---------------------------------------	----

II. 2. Recherche de la production des activités protéasiques sur milieu liquide.....	16
--	----

II. 2. 1. Préparation des surnageants.....	16
--	----

II. 2. 2. La technique des puits.....	16
---------------------------------------	----

II. 2. 3. Étude de la stabilité des surnageants actifs en fonction de la température.....	16
---	----

III. Caractérisation phénotypique des isolats les plus prometteurs.....	16
---	----

III. 1. Caractères microscopiques.....	16
--	----

III. 2. Caractères macroscopiques.....	17
--	----

III. 3. Croissance à différentes conditions de température, pH et salinité.....	17
---	----

III. 4. Caractères biochimiques.....	17
--------------------------------------	----

III. 4. 1. Recherche de la catalase.....	17
--	----

III. 4. 2. Recherche de l'oxydase.....	18
--	----

III. 4. 3. Le test Mannitol-Mobilité.....	18
---	----

III. 4. 4. Recherche du type respiratoire.....	18
--	----

III. 4. 5. Le système API ID32.....	18
-------------------------------------	----

III. 4. 6. Étude du profil de sensibilité des isolats aux antibiotiques.....	19
--	----

## **Résultats et discussion**

<b>I. Screening des activités enzymatiques extracellulaires des isolats</b>	<b>20</b>
---	-----------

I. 1. Résultats	20
I. 1. 1. Recherche de la production des activités enzymatiques extracellulaires sur milieu gélosé.....	20
I. 1. 2. Recherche de la production des activités protéasiques sur milieu liquide.....	23
I. 1. 3. Étude de la stabilité thermique des surnageants actifs .....	24
I. 2. Discussion.....	25
<b>II. Caractérisation phénotypique des isolats les plus prometteurs.....</b>	<b>28</b>
II. 1. Résultats .....	28
II. 1. 1. Caractérisation microscopique.....	28
II. 1. 2. Caractérisation macroscopique.....	28
II. 1. 3. Caractérisation physiologique.....	29
II. 1. 4. Caractérisation biochimique.....	29
II. 1. 5. Étude du profil de sensibilité des isolats aux antibiotiques.....	32
II. 2. Discussion.....	32
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>35</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>37</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>47</b>

## ملخص

توفر الإنزيمات التي تنتجها الكائنات الحية الدقيقة المحبة او المقاومة للملح، إمكانيات عديدة لتطبيقات مبتكرة في مختلف المجالات. نظرًا لأهميتها في مجال التكنولوجيا الحيوية والحاجة الحالية لمنتجات أكثر كفاءة لمثل هذه المحفزات، تهدف هذه الدراسة إلى فحص الإنزيمات المحللة: الأميلاز، البروتياز، السيلولاز، الإستيراز والليباز من عشر عزلات معزولة من السبخة الكبرى بوهرا. تم تقييم إنتاج الإنزيم على وسط الأجار بتركيز 15% من NaCl. من بين العزلات العشرة، أظهرت 9 عزلات نشاطاً تحليلياً ملحوظاً ضد ما لا يقل عن 4 مكونات مع تفوق نشاط الأنزيم المحلل للبروتين والسليولوز.

تم اختيار عزلتين، LMB3S04 و LMB3S25، لنطاقهما الواسع من النشاط التحليلي ومستويات LEA العالية لدراسة أنشطتهما الأنزيمية على الوسط مغذي سائل. كشفت هذه الدراسة عن نشاط كبير للأنزيم المحلل للبروتين لدى العزلة LMB3S25. أظهرت اختبارات الثبات الحراري عند 55 درجة مئوية و 70 درجة مئوية و 100 درجة مئوية لمدة 10 دقائق، تحفيزاً حرارياً لنشاط انزيم البروتياز عند 55 درجة مئوية، وانخفاضاً للنشاط عند 70 درجة مئوية واختفاء كامل للنشاط عند 100 درجة مئوية.

كما تم إخضاع العزلات المختارة للتوصيف الظاهري. ظهرت على شكل عصيات موجبة الجرام، متحركة، تمتلك انزيمات الكاتلاز والأكسيداز. كشف نظام ID 32 عن إمكانيات ايجابية مثيرة للاهتمام ونشاط انزيمي واعد. أتاحت دراسة تحمل كلوريد الصوديوم تصنيف العزلة LMB3S04 من بين البكتيريا المتحملة للملح بشكل معتدل والعزلة LMB3S25 من بين البكتيريا المحبة للملح بشدة. أظهر النمو عند درجات حرارة ومستويات pH مختلفة صفات التحمل الحراري والقلوي للعزلات. أظهر مخطط المضادات الحيوية مظاهر مقاومة متنوعة، وأبدت العزلات مقاومة للفانكوميسين والفسفومييسين، وحساسية للكاناميسين. فيما يتعلق بالأموكسيسيلين، وجد ان العزلة LMB3S25 حساسة و العزلة LMB3S04 مقاومة. فيما يتعلق بالتوبراميسين، أظهرت العزلة LMB3S25 مقاومة، على عكس العزلة LMB3S04 التي أظهرت حساسية.

قد تشكل هذه العزلات وإنزيماتها مصادر واعدة لمختلف تطبيقات التكنولوجيا الحيوية.

**الكلمات المفتاحية :** البيئات المالحة ، البكتيريا المحبة و المقاومة للملحة ، الانزيمات ، التطبيقات البيوتكنولوجية.

# Résumé

Les enzymes produites par les microorganismes halophiles et halotolérants offrent de nombreuses possibilités d'applications innovantes dans des domaines variés. Compte tenu de leur importance biotechnologique et du besoin actuel de producteurs plus efficaces de tels catalyseurs, la présente étude visait à cribler des enzymes hydrolytiques : amylases, protéases, estérases et lipases de dix souches isolées de la Grande sebkha d'Oran. La production des enzymes a été évaluée sur milieu gélosé à une concentration de 15% de NaCl. Sur les dix isolats, 9 isolats ont montré des activités hydrolytiques significatives contre au moins de 4 substrats avec une dominance des activités protéasique et cellulosique.

Deux isolats, le LMB3S04 et LMB3S25, ont été sélectionnés pour leur large spectre d'activité hydrolytique et leurs niveaux LEA élevés pour la mise en évidence de leurs activités enzymatiques extracellulaires sur milieu liquide. Cette étude a révélé une activité protéasique importante pour l'isolat LMB3S25. L'étude de sa stabilité thermique réalisée à 55°C, 70°C et 100°C pendant 10 minutes a montré une thermoactivation à 55°C, une diminution de l'activité à 70°C et une désactivation complète à 100°C.

Les isolats sélectionnés ont également été soumis à une caractérisation phénotypique. Ils se présentent sous forme de bâtonnets à Gram positif, mobiles, et possédant une catalase et oxydase. Le système ID 32 a révélé un potentiel métabolique intéressant et un bagage enzymatique prometteur. L'étude de la tolérance au NaCl a permis de classer l'isolat LMB3S04 parmi les bactéries modérément halotolérantes et l'isolat LMB3S25 parmi les bactéries halophiles extrêmes. La croissance à différentes températures et pH a mis en évidence les caractères thermotolérants et alcalitolérants des isolats. L'antibiogramme a révélé des profils de résistances variés, les isolats ont montré une résistance à la Vancomycine et la Fosfomycine, et une sensibilité à la Kanamycine. Concernant l'amoxicilline, l'isolat LMB3S25 s'est avéré sensible, tandis que l'isolat LMB3S04 a montré une résistance. En ce qui concerne la Tobramycine, l'isolat LMB3S25 a montré une résistance, contrairement à l'isolat LMB3S04 qui y est sensible.

Ces isolats ainsi que leurs enzymes peuvent constituer des candidats prometteurs pour diverses applications biotechnologiques.

**Mots clés :** écosystèmes salins, bactéries halophiles et halotolérantes, enzymes, applications biotechnologiques



## Abstract

Salt-tolerant enzymes produced by halophilic and halotolerant microorganisms offer numerous opportunities for innovative applications in various fields. Given their biotechnological significance and the current need for more efficient producers of such catalysts, the present study aimed to screen for hydrolytic enzymes, including amylases, proteases, esterases, and lipases, from ten strains isolated from the Great Sebkhah of Oran. Enzyme production was evaluated on agar medium containing 15% NaCl. Out of the ten isolates, nine exhibited significant hydrolytic activities against at least four substrates, with a predominance of proteolytic and cellulolytic activities.

Two isolates, LMB3S04 and LMB3S25, were selected for their broad spectrum of hydrolytic activities and high levels of extracellular enzyme activity (LEA) for further investigation of their enzymatic activities in liquid medium. This study revealed significant protease activity for isolate LMB3S25. Thermal stability testing at 55°C, 70°C, and 100°C for 10 minutes showed thermoactivation at 55°C, a decrease in activity at 70°C, and complete deactivation at 100°C.

The selected isolates were also subjected to phenotypic characterization. They appeared as Gram-positive, rod-shaped, motile bacteria possessing catalase and oxidase. The ID 32 system revealed an interesting metabolic potential and a promising enzymatic profile. The study of NaCl tolerance classified isolate LMB3S04 as moderately halotolerant and isolate LMB3S25 as extremely halophilic. Growth at different temperatures and pH levels highlighted the thermotolerant and alkalitolerant nature of the isolates. Antibiotic susceptibility testing revealed varied resistance profiles: the isolates were resistant to vancomycin and fosfomicin, and sensitive to kanamycin. Regarding amoxicillin, isolate LMB3S25 was sensitive, while isolate LMB3S04 showed resistance. For tobramycin, isolate LMB3S25 exhibited resistance, whereas isolate LMB3S04 was sensitive.

These isolates and their enzymes may serve as promising candidates for various biotechnological applications.

**Keywords** : saline ecosystems, halophilic and halotolerant bacteria, enzymes, biotechnological applications.

## Liste des Abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**BN** : Bouillon nutritif

**EC** : enzyme classe

**GN** : gélose nutritive

**kDa** : kilodalton

**LEA** : Level Enzymatic Activity

**M** : molaire

**nm** : nanomètre

**p/v** : poids / volume

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**VF** : Viande foie

**μ S** : Microséismes

## Liste des figures

- Figure 1 :** Fréquences (%) d'isolats producteurs des activités hydrolytiques pour chaque substrat. **20**
- Figure 2 :** Photos des résultats du screening des activités enzymatiques sur milieu gélosé de certains isolats. **21**
- Figure 3 :** Heatmap avec dendrogramme représentant les clusters et les activités enzymatiques des isolats. **23**
- Figure 4 :** Photo du résultat de l'activité protéasique des surnagants des isolats sélectionnés inoculés sur BN à 15% de NaCl additionné de caséine **24**
- Figure 5 :** Résultats de l'activité protéasique des surnagants de l'isolat LMB3S25 après les différents traitements thermiques (55, 70 et 100°C pendant 10 minutes). **24**
- Figure 6 :** Photos des résultats de la coloration de Gram des isolats après 24 heures d'incubation sur GN à 15% de NaCl à 30°C (microscope photonique à objectif 100 à immersion). **28**
- Figure 7 :** Photos des aspects macroscopiques des isolats après 24 heures d'incubation sur GN à 15% de NaCl à 30°C. **29**
- Figure 8 :** Photos de résultats du test catalase (A) et Oxydase (B) des isolats **30**
- Figure 9 :** Photos des résultats du test Mannitol-Mobilité (A) et type respiratoire (B) **30**
- Figure 10 :** Photos des résultats de la caractérisation biochimiques des isolats par le système ID32 après 24 heures d'incubation à 30°C. **31**

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Les groupes des microorganismes thermophiles selon les définitions de <b>Hughes-Pask et Williams (1977)</b> et de <b>Gupta <i>et al.</i> (2014)</b> .	<b>4</b>
<b>Tableau 2 :</b> Les principales classes des enzymes et les types des réactions catalysées.	<b>10</b>
<b>Tableau 3 :</b> Caractères physico-chimiques de la grande sebkha d'Oran dans la saison hiver ( <b>Nas <i>et al.</i>, 2021</b> ).	<b>14</b>
<b>Tableau 4 :</b> Les niveaux des activités enzymatiques (LEA) obtenus pour chaque isolat.	<b>22</b>
<b>Tableau 5 :</b> Clustering des isolats et classification de leur pouvoir enzymatique	<b>22</b>
<b>Tableau 6 :</b> Diamètres des zones d'hydrolyse et les LEA de l'activité protéasique du surnagent de l'isolat LMB3S25 avant et après traitement thermique	<b>24</b>
<b>Tableau 7 :</b> Intervalles de salinité, de température et de pH permettant la croissance des isolats.	<b>29</b>
<b>Tableau 8 :</b> Propriétés métaboliques des isolats mis en évidence par la galerie ID32	<b>31</b>
<b>Tableau 9 :</b> Résultats de l'étude de la sensibilité des isolats aux antibiotiques	<b>32</b>

# **Introduction**

### **Introduction**

Jusqu'au 20<sup>ème</sup> siècle, il était communément admis que la vie ne pouvait exister que dans des habitats présentant des conditions compatibles avec celles nécessaires à la vie. Cependant, à partir des années 1930, des recherches ont révélés certains environnements extrêmes tels que les régions volcaniques, les lacs salés, les sources hydrothermales, la calotte glaciaire de l'Antarctique et les milieux alcalins ou acides, sont colonisés des microorganismes capables de se développer et de fonctionner métaboliquement et biochimiquement au-delà des limites physicochimiques connues de la vie. Ce groupe de microorganismes est désigné sous le nom d'extrêmophiles (**Merino et al., 2019**).

La découverte majeure dans ce domaine est celle réalisée par **Thomas Brock** en **1969**, lorsqu'il a isolé une espèce thermophile, *Thermus aquaticus*, à partir d'une source thermale dans le parc de Yellowstone aux États-Unis. Cette espèce est la source de l'enzyme Taq polymérase qui est essentielle pour l'élongation des brins d'ADN à haute température lors de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) (**Brock, 1997**).

En fonction des conditions extrêmes auxquels les microorganismes extrêmophiles sont confrontés, ils peuvent être halophiles ou halotolérants, thermophiles, psychrophiles, alcalophiles, acidophiles ou piézophiles (**Kochhar et al., 2022**).

Ces groupes de microorganismes constituent un domaine de recherche crucial pour diverses disciplines, notamment la biologie environnementale, l'étude des mécanismes d'adaptation cellulaire, moléculaire et génétique aux conditions extrêmes, leur implication dans les cycles biogéochimiques, et plus spécifiquement, dans le domaine de la biotechnologie (**DasSarma et al., 2020 ; Schultz et Rosado, 2020**).

Les microorganismes halophiles et halotolérants représentent des exemples fascinants de microorganismes adaptés aux environnements extrêmes. Ils sont reconnus comme une source précieuse de métabolites secondaires résilients aux conditions extrêmes, offrant une diversité d'applications biotechnologiques. Ces applications comprennent la production de diverses biomolécules telles que les solutés compatibles, les exopolysaccharides, les biosurfactants, les caroténoïdes, les agents antimicrobiens et les extrêmoenzymes, ainsi que leur utilisation potentielle dans des processus de bioremédiation environnementale et dans la lutte biologique contre les phytopathogènes (**Dutta et Bandopadhyay, 2022 ; Guevara-Luna et al., 2024**).

Les microorganismes halophiles et halotolérants produisent des enzymes d'une stabilité exceptionnelle capables de maintenir leur activité à des concentrations élevées de sel, ainsi qu'à des variations de température, de pH alcalin et à la présence de solvants organiques. Cette

## ***Introduction***

stabilité les rend très utiles dans divers secteurs industriels telles que l'industrie pharmaceutique (synthèse de produits pharmaceutiques), l'industrie alimentaires (amélioration de la texture et de la saveur des produits alimentaires), l'industrie de textile (utilisation dans les détergents de blanchisserie) et en biotechnologie environnementale (traitement des sols contaminés par des métaux lourds) (**Gupta et al., 2022 ; Ruginescu et al., 2022**).

Bien que l'Algérie soit riche en écosystèmes salins naturels et originaux, et que plusieurs études aient démontré que ces habitats sont des sources prometteuses de microorganismes produisant des extrêmoenzymes (**Quadri et al., 2016 ; Nas et al., 2021 ; Saibi et al., 2022**), ces enzymes ne sont pas encore produites à une échelle industrielle et ne sont donc pas disponibles commercialement. C'est fort de ce constat que cette étude s'inscrit dans la volonté qui convoite une valorisation biotechnologique des microorganismes extrêmophiles isolés à partir des habitats extrêmes algériens.

Pour cela, nous nous sommes fixés comme objectif primordiale le criblage des activités enzymatiques d'intérêt biotechnologique à partir d'un ensemble de dix (10) bactéries extrêmophiles issues de la grande sebkha d'Oran. Ces isolats font partie d'une collection isolée par Dr. NAS Fatima le 21 septembre 2019 à partir des échantillons d'eau de la Sebkha.

# **Synthèse**

# **bibliographique**



## **I. Les microorganismes extrêmophiles**

### **I. 1. Définition**

Le terme « extrêmophiles » a été inventé pour la première fois, en 1974, par Mac ELROY, dans un article intitulé ‘Some comments on the evolution of extremophiles’, il a été interprété par de plusieurs manières avant d’être finalement associé aux microorganismes qui peuplent des niches écologiques extrêmes caractérisées par des conditions défavorables pour le développement de la vie. Ces conditions incluent des températures très élevées ou très basses, des niveaux de pH extrêmes, des pressions élevées, et des concentrations élevées de sel ou d’autres substances chimiques (**Irwin et Baird, 2004**).

La notion d’extrémophilie obligatoire est différente de celle de la résistance aux conditions extrêmes, elle implique que les cellules ne réalisent leur cycle vital que dans des conditions extrêmes (**Alber et al., 2001 ; Fongaro et al., 2020**).

### **I. 2. Classification des microorganismes extrêmophiles**

Les microorganismes extrêmophiles sont répartis en plusieurs groupes selon les paramètres physiques (pression, température...), ou chimiques (acidité, salinité...) dans lesquels ils vivent. Parmi les groupes les plus étudiés, nous citons : les thermophiles, les psychrophiles, les halophiles, les acidophiles et les alcalophiles.

#### **I. 2. 1. Les microorganismes extrêmophiles et la salinité**

Les microorganismes vivants dans les environnements salins ou hypersalins sont divisés en plusieurs groupes :

- Les microorganismes halophiles stricts qui requièrent la présence du sel pour leur croissance optimale, ils nécessitent un minimum de 1 M de sel. En fonction des besoins optimaux en sel pour leur croissance, trois catégories sont définies (**Abaramak et al., 2020**) :
  - **Les microorganismes légèrement halophiles** : ils se développent sur un intervalle de salinité de 0,34 à 0,85 M.
  - **Les halophiles modérés** : ils se développent à des concentrations comprises entre 0,85 et 3,4 M de NaCl.
  - **Les halophiles extrêmes** : ils poussent à des concentrations de sel allant de 3,4 à 5,1 M.
- Les microorganismes halotolérants : ont la capacité de pousser en présence ou en absence de sel. Ils sont classés en trois catégories selon les concentrations saines tolérées (**Rahman et al., 2017**) :

- **Les microorganismes légèrement halotolérants** qui tolèrent des concentrations de NaCl allant de 0 jusqu'à 6 à 8% de NaCl (p/v).
  - **Les microorganismes modérément halotolérants** qui tolèrent des concentrations de NaCl allant de 0 jusqu'à 18 à 20% de NaCl (p/v).
  - **Les microorganismes extrêmement halotolérants** qui se développent sur toute la gamme de salinité allant de 0 jusqu'à la saturation (30% de sel)
- Les microorganismes nécessitant moins de 2% (p /v) de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérés comme halophiles.

### I. 2. 2. Les microorganismes extrémophiles et la température

Les microorganismes extrémophiles se trouvent dans des écosystèmes où les températures atteignent des valeurs extrêmes. Les microorganismes extrémophiles se trouvent dans des écosystèmes où les températures atteignent des valeurs extrêmes. Ils habitent des environnements à température très élevée, tels que les fumeurs noirs et les sources hydrothermales, ainsi que des environnements à température très basse, comme les mers froides polaires, les glaciers alpins et les sédiments océaniques.

De nombreuses définitions sont retrouvées dans la littérature pour qualifier les microorganismes thermophiles. **Hughes-Pask et Williams (1977)** ont classé les thermophiles en fonction de leur tolérance à la température. En **2014, Gupta et al.** ont proposé une autre classification basée sur la température optimale de croissance. Ils ont définis trois groupes (**Tableau 1**). Cette classification est actuellement privilégiée, supplantant les classifications antérieures.

**Tableau 1:** Les groupes des microorganismes thermophiles selon les définitions de **Hughes-Pask et Williams (1977)** et de **Gupta et al. (2014)**.

Classification de Hughes-Pask et Williams (1977)		Classification de Gupta et al., (2014)	
Groupes	Températures tolérées	Groupes	Température optimale
<b>Thermophiles obligatoires</b>	Opt 65 - 75 °C Aucun croissance à T°C < à 40 °C	<b>Thermophiles modérés</b>	50 - 60°C
<b>Thermophiles facultatifs</b>	Opt à 50 - 60 °C avec croissance aux alentours de 37 °C		
<b>Thermophiles extrêmes</b>	Croissance à 40 -70 avec opt à 65 °C	<b>Thermophiles extrêmes</b>	60 - 80°C
<b>Les hyper-thermophiles</b>	Opt 80 - 115°C	<b>Les hyper-thermophiles</b>	80 - 110°C

Quant aux microorganismes psychrophiles, sont ceux capables de croître de manière optimale à des températures inférieures ou égales à 15 °C et ne pouvant se développer au-dessus de 20 °C. ils colonisent les eaux glacières et les régions polaires où la lumière disparaît tout près de trois mois par année, où les ressources nutritives ne sont présentes qu'en faible quantité et où la température descend parfois à des niveaux incroyablement bas (**Vincent et al., 2004 ; Boetius et al., 2015**).

### **I. 2. 3. Les microorganismes extrêmophiles et le pH**

Les microorganismes qui prospèrent dans des conditions de pH extrêmement bas ou élevés, sont respectivement désignés sous les termes d'acidophiles et d'alcaliphiles.

Les micro-organismes acidophiles se développent de manière optimale à un pH inférieur à 3. On les trouve dans des environnements acides naturels tels que les champs solfatares, les bassins sulfuriques et les geysers, ainsi que dans des environnements artificiels créés par des activités humaines, comme l'exploitation minière de charbon et de minerais métalliques. (**Sharma et al., 2012**).

Les alcaliphiles se développent dans des environnements alcalins avec un pH égale ou supérieur à 9, présentant généralement une croissance optimale à un pH d'environ 10. Ils se trouvent dans les lacs de soude comme exemple le Lake Magadi au Kenya, et les sols riches en carbonates de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (**Sysoev et al., 2021**).

Les microorganismes acidophiles et alcaliphiles produisent des enzymes stables à des pH extrêmes, notamment des xylanases, des ligases, des amylases, des estérases, des protéases et des cellulases. Les enzymes alcaliphiles ont été utilisées dans diverses applications dans des industries telles que celle des détergents, du papier, cosmétiques, pharmaceutiques, ou encore dans l'hydrolyse de l'amidon et le traitement des eaux usées des tanneries, alors que les acidophiles sont utilisés dans le traitement des minéraux, en particulier pour l'oxydation des sulfures minéraux dans les bioréacteurs industriels (**Sharma et al., 2012 ; Li et al., 2017**).

## **II. Les bactéries halophiles et halotolérantes**

### **II. 1. Les biotopes naturels des bactéries halophiles et halotolérantes**

Les environnements salins et hypersalins naturels sont représentés par des systèmes terrestres et aquatiques, ils comprennent les sols salins, les lacs salés (comme exemple le Grand Lac Salé en USA), les chotts (Chott El Beidha Hammam Essoukhna en Algérie) et les sebkhas (la grande Sebkha d'Oran en Algérie).

### II. 1. 1. Les sols salins

Selon une classification initiale, un sol est considéré comme salin lorsque la conductivité électrique de son extrait saturé dépasse 4000 micro-siemens par centimètre ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) (**Richards, 1954**). En 2007, le World Soil Resources Reports a révisé cette valeur de référence à 15000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (**WRB, 2007**). En 2010, le système de classification du Soil Survey Staff a encore ajusté ce seuil, le portant à 30 000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (**Soil Survey Staff, 2010**).

### II. 1. 2. Les milieux salins aquatiques

Les eaux sont considérées salées lorsque leur concentration en sels solubles dépasse 0,3% (p/v) et hypersalées quand elles présentent des concentrations salines supérieures à celles de l'eau de mer (**DasSarma et DasSarma, 2012**).

En se basant sur l'origine des sels, leur type et leur proportion, les eaux salines et hypersalines sont classées en deux catégories : les eaux thalassohalines et les eaux athalassohalines (**Akpolat et al., 2021**) :

- **Les eaux thalassohalines** : sont issues suite à l'évaporation de l'eau de mer. Leur composition ionique est identique à celle de l'eau de mer dont le sodium et le chlorure constituent les ions les plus dominants. Leur pH est proche de la neutralité ou légèrement alcalin (exemples : Le Grand Lac Salé de l'Utah, la mer Rouge et les lacs du désert d'Atacama au Chili).
- **Les eaux athalassohalines** : elles sont formées par la dissolution des dépôts salés fossiles dérivés de sources d'eau douce (rivières de montagne...). Leur composition ionique est différente à celle de l'eau de mer avec une dominance des cations divalents  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . Elles constituent des systèmes de lacs alcalins de soude ou de sulfate, mais ils peuvent également être très acides, notamment dans les régions volcaniques. De tels environnements sont représentés par la Mer Morte en Palestine, le Lac Rose au Sénégal et Wadi An Naturn en Egypte.

### II. 2. Les stratégies d'adaptation des bactéries halophiles et halotolérants

Dans les environnements salins et hypersalins, les microorganismes sont confrontés à divers défis tels que la déshydratation, le stress osmotique et la faible activité de l'eau. Pour surmonter ces obstacles, les micro-organismes halophiles et halotolérants ont développé des stratégies qui reposent sur l'accumulation, dans leur cytoplasme, de petites molécules organiques appelées les osmoprotecteurs ou inorganiques ; le KCl (**Gunde-Cimerman et al., 2018**). Ces deux stratégies permettent de contrebalancer la pression osmotique externe en créant

une haute pression osmotique dans le cytoplasme, ce qui maintient le cytoplasme en iso-osmose avec le milieu environnant (Oren, 2008).

### II. 2. 1. La stratégie d'adaptation par accumulation de KCl

Elle est appelée aussi Salt-in ou High salt-in strategy. Elle a pour but d'empêcher la sortie d'eau par accumulation du KCl dans le cytoplasme. Les ions  $K^+$  entrent passivement via un système uniport sous l'impulsion du potentiel de membrane, une partie de sodium cellulaire est remplacée par le potassium. L'afflux des cations doit être compensé par un nombre équivalent d'anions  $Cl^-$ , ces derniers vont pénétrer grâce à une pompe  $Na^+/Cl^-$ . Ce mécanisme est largement adopté chez les *Archaea* halophiles extrêmes et certaines bactéries halophiles extrêmes comme les *Salinibacter* (Pastor *et al.*, 2013 ; Aljohny, 2015).

L'accumulation de concentrations élevées de KCl dans le cytoplasme nécessite une adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire car elle soumet les microorganismes à un nouveau stress cellulaire. Toutefois, les microorganismes halophiles et halotolérants ne semblent pas affectés par ce stress. Leurs protéines restent non seulement fonctionnelles et stables à de telles salinités, mais se dénaturent également lorsque la concentration de KCl diminue en dessous de 1 M (Edbeib *et al.*, 2016).

### II. 2. 2. La stratégie d'adaptation par production ou accumulation d'osmoprotecteurs

Cette stratégie, également connue sous le nom de "Compatible-solute strategy" ou "Low salt-in strategy", repose sur l'exclusion du sodium et l'accumulation de "solutés compatibles". Ces solutés sont des composés organiques de faible poids moléculaire, solubles dans l'eau, qui peuvent être synthétisés par la cellule ou importés de l'environnement externe via des systèmes de transport sans perturber le métabolisme cellulaire. Parmi ces composés, on trouve des polyols et leurs dérivés, des sucres et leurs dérivés, des acides aminés et leurs dérivés, des bétaines et des ectoines (Shivanand et Mugeraya, 2011).

Ce mécanisme est largement adopté par les trois domaines de la vie : *Archaea*, *Eucarya* et *Bacteria*. Les microorganismes utilisant cette stratégie démontrent une flexibilité accrue dans l'adaptation à la pression osmotique par rapport à ceux employant le mécanisme d'accumulation de KCl. De plus, l'adaptation à la salinité via l'accumulation de solutés organiques requiert moins de modifications de la machinerie enzymatique intracellulaire que la stratégie d'accumulation d'ions potassium. Toutefois, la production de ces solutés organiques est énergétiquement coûteuse (Oren, 2002).

### **II. 3. Diversité phylogénétique des bactéries halophiles et halotolérantes**

Le domaine des *Bacteria* regroupe la plus grande diversité des halophiles et des halotolérants. Ils sont présentes dans plusieurs phylums, notamment *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes* (Gibtan et al., 2017).

Les cyanobactéries, également appelées algues bleu-vert, bactéries bleu-vert ou *Cyanophyta*, peuvent se trouvent dans une vaste gamme de concentrations de sel, de l'eau douce aux habitats hypersalins avec 25% de NaCl. Parmi les espèces les plus répandues figurent la cyanobactérie unicellulaire *Aphanothece halophytica* ainsi que les espèces filamenteuses *Microcoleus chthonoplastes* et *Halospirulina tapeticola* (Oren, 2012).

Dans le phylum de *Proteobacteria*, la classe omniprésente dans les milieux hypersalins est celle des *Gammaproteobacteria* avec les ordres de *Alteromonadales*, *Vibrionales*, *Pseudomonadales*, *Oceanospirillales*, *Enterobacteriales*, et *Legionellales* (Naghoni et al., 2017).

Les bactéries du phylum *Firmicutes* présentent une grande diversité morphologique et physiologique, leur permettant d'habiter une vaste gamme d'environnements. Les classes *Clostridia* et *Bacilli* sont les plus dominantes, avec un nombre important d'espèces halophiles isolées de divers habitats salins et hypersalins. La famille des *Bacillaceae* de la classe *Bacilli* est la plus importante avec 21 genres contenant des espèces halophiles modérées et/ou halotolérantes dont les genres les plus représentés : *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Bacillus*, *Lentibacillus*, *Alkalibacillus*. Dans la classe des *Clostridia*, les espèces halophiles sont regroupés dans les deux familles *Halanaerobiaceae* et *Halobacteroidaceae* de l'ordre des *Halanaerobiales* (de la Haba et al., 2011).

Les membres halophiles du phylum *Actinobacteria* sont présentés par le genres *Actinopolyspora*, *Corynebacterium* (*Corynebacterium halotolerans*), *Haloglycomyces* (*Haloglycomyces albus*), *Georgenia*, *Nesterenkonia*, *Isoptricola*, *Haloactinobacterium*, *Amycolaptosis*, *Praseurella*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Nocardioopsis*, *Streptomonospora*, *Halactinospora*, *Marinactinospora*. Dans le phylum de *Spirochaetes*, les espèces halophiles appartiennent au genre *Spirochaeta* (*Spirochaeta halophila*, *Spirochaeta africana* et *Spirochaeta alkalica* et *Spirochaeta asiatica* (de la Haba et al., 2011).

Dans le phylum des *Bacteroidetes*, certaines espèces bactériennes sont des halophiles extrêmes comme *Salinibacter ruber*. Cette espèce nécessite des concentrations en sels très élevée avec une croissance optimale à 30 % de sel (p/v) (Didari *et al.*, 2020).

Le phylum *Deinococcus-Thermus* reconnu comme l'un des phyla bactériens les plus extrêmophiles, contient deux ordres *Deinococcales* comprenant les genres *Deinococcus*, *Deinobacterium* et *Truepera*, et l'ordre *Thermales* avec les genres : *Thermus*, *Meiothermus*, *Marinithermus*, *Oceanithermus* et *Vulcanithermus*. Les membres de ce phylum ont été isolés à partir des habitats où la salinité dépasse 34% (p/v) (Abdallah *et al.*, 2016).

### III. Production des enzymes par les bactéries halophiles et halotolérantes

#### III. 1. Définitions des enzymes

Les enzymes sont des biomolécules protéiques qui catalysent des réactions biochimiques avec une précision remarquable. Elles accélèrent la vitesse des réactions chimiques de plus de  $10^6$  fois par rapport à celles se produisant en leur absence, en abaissant l'énergie d'activation requise (Granner *et al.*, 2008).

Les enzymes sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle crucial en régulant les processus métaboliques. Elles facilitent la conversion des nutriments en énergie et en matériaux cellulaires, assurant ainsi le bon fonctionnement et la survie des cellules.

#### III. 2. Les classes des enzymes

Les enzymes sont classifiées en fonction du type de réaction qu'elles catalysent. Cette classification est standardisée par la Commission des Enzymes (EC) de l'Union Internationale de Biochimie et Biologie Moléculaire (IUBMB). Chaque enzyme reçoit un numéro EC unique composé de quatre chiffres hiérarchiques séparés par des points, qui précisent la classe, la sous-classe, la sous-sous-classe, et le substrat spécifique ou le mécanisme de la réaction (par exemple : EC1.1.1.1 pour l'alcool déshydrogénase) (Kim *et al.*, 2023). Le **tableau 2** présente les six classes principales d'enzymes.

**Tableau 2 :** Les principales classes des enzymes et les types des réactions catalysées.

EC (classe)	Nomenclature	Type de réaction catalysée
EC1	Oxydoréductases	Catalysent les réactions d'oxydoréduction, où il y a transfert d'électrons ou d'hydrogènes entre molécules. <b>Exemples :</b> déshydrogénases, oxydases
EC2	Transférases	Transfèrent des groupes fonctionnels (comme des groupes méthyle, acyle, amine) d'une molécule à une autre. <b>Exemples :</b> kinases, aminotransférases.
EC3	Hydrolases	Catalysent la rupture de liaisons (C-O, C-N, C-C, etc.) par l'addition d'eau. <b>Exemples :</b> protéases, lipases, nucléases.
EC4	Lyases	Catalysent la rupture de liaisons (C-C, C-O, C-N) par des mécanismes autres que l'hydrolyse et l'oxydation, souvent formant une nouvelle double liaison ou un nouvel anneau. <b>Exemples :</b> décarboxylases, aldolases
EC5	Isomérases	Catalysent les changements au sein d'une molécule, en réarrangeant les atomes. <b>Exemples :</b> épimérases.
EC6	Ligases	Catalysent la formation de liaisons avec couplage à l'hydrolyse de l'ATP ou d'autres nucléotides. <b>Exemples :</b> synthétases, carboxylases.

### III. 3. Les hydrolases produites par les bactéries halophiles et halotolérantes et leurs applications biotechnologiques

Les microorganismes halophiles et halotolérants présentent une excellente source d'enzymes stables et fonctionnelles sous les conditions physicochimiques des processus industriels. Ces enzymes ne sont pas uniquement stables et actives à des concentrations élevées de sel, mais, elles sont également tolérantes à des températures basses et élevées, stables à des pH alcalins et en présence de solvants organiques (**Di Donato et al., 2018**).

Les hydrolases (EC3 dans la classification Enzyme Commission) sont omniprésentes dans la nature et sont largement distribuées parmi les microorganismes, notamment les bactéries et les champignons. Ces enzymes jouent un rôle essentiel dans la modification et à la



dégradation de la biomasse et des macromolécules complexes, tant au niveau environnemental, où elles contribuent à la plupart des processus géochimiques, qu'au niveau industriel en tant qu'ingrédients essentiels dans la plupart des industries alimentaires, agricoles et pharmaceutiques (Singh *et al.*, 2016). Parmi les hydrolases isolées des bactéries halophiles et halotolérants : les amylases, les lipases, les protéases, la xylanase, la DNase, l'inulinase, la pectinase, la cellulase et la pulullanase (de Lourdes *et al.*, 2013).

### III. 3. 1. Les amylases

Les amylases sont des hydrolases de type endoglycanases. Elles agissent sur les liaisons (1-4) glycosidiques de l'amidon pour produire des dextrans et de petits polymères composés d'unités de glucose et de maltose. Elles sont largement utilisées dans l'industrie de la saccharification d'amidon, alimentaire, papeterie, de textile, de boulangerie, de brassage, des détergents et pharmaceutique (Gopinath *et al.*, 2017).

Les amylases halophiles se distinguent par leur stabilité exceptionnelle dans une large gamme de salinité, de pH et à des températures supérieures à 50 °C, cette résilience fait d'elles des candidates idéales pour diverses applications industrielles, notamment le traitement des eaux usées riches en sel et en résidus d'amidon (Yin *et al.*, 2015).

Une amylase halophile extracellulaire a été purifiée à partir de *Thalassobacillus* sp. LY18. Cette enzyme présentait une masse moléculaire de 31 kDa et montre une activité enzymatique optimale à 70 °C, pH 9,0 et 10 % de NaCl. Elle démontre une stabilité remarquable sur une large plage de températures (30 à 90 °C), de pH (6,0 à 12,0) et de concentrations de NaCl (0 à 20 %) (Li et Yu, 2012).

### III. 3. 2. Les protéases

Les protéases sont des enzymes hydrolytiques qui catalysent le clivage des liaisons peptidiques au sein des molécules protéiques. Elles sont utilisées dans les détergents de blanchisserie, dans la transformation et la fabrication des produits alimentaires, dans l'industrie pharmaceutique et dans les industries de tannage de cuir aussi bien que dans la gestion des déchets (Ahmad *et al.*, 2020).

Une protéase CP1 purifiée à partir de l'espèce halophile *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 a démontré une activité optimale à une température de 55°C, pH de 8.5 et une halotolérance de 0 à 4M NaCl (Sánchez-Porro *et al.*, 2003).

### III. 3. 3. Les lipases

Les lipases incluent des carboxyle-estérasés, des lipases proprement dites et des phospholipases, leur majeure fonction est l'hydrolyse des triglycérides pour libérer des acides

gras et du glycérol. Elles catalysent également des réactions d'estérifications (**Sangeetha et al., 2011**). Ces enzymes peuvent agir à un intervalle large de pH, elles ont des applications dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, dans la fabrication des détergents, du papier, des produits cosmétiques, des carburants et des produits pharmaceutiques, ainsi que dans le contrôle de la pollution et le traitement des eaux usées (**Calimlioglu et Arga, 2014**).

### **III. 3. 4. Les cellulases**

Il s'agit d'un groupe d'enzymes qui catalysent la rupture de la liaison glycosidique  $\beta$ -1,4 de la molécule de cellulose. Elles sont classées en fonction du site hydrolytique spécifique en trois groupes : endoglucanase, exoglucanase et  $\beta$ -glucosidase

Les cellulases halophiles sont stables et actives à des concentrations élevées de sel, ce qui les rend idéales pour des processus industriels où de telles conditions prévalent. Elles peuvent être utilisées dans divers secteurs comme la production de bioéthanol, la bioremédiation, le traitement des déchets agricoles, et l'industrie textile (**Yousef et Mawad, 2022**).

# **Matériel et méthodes**

L'ensemble de ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (**L.A.M.A.A.B.E.**) de l'université Abou Bakr Belkaid (Tlemcen).

### **I. Origine des souches**

Les isolats utilisés pour cette étude proviennent d'une collection de souches bactériennes isolées par Dr. NAS Fatima, le 21 septembre 2019, à partir des échantillons d'eau prélevés de la grande Sebkhah d'Oran. La collection a été conservée à -20°C sur Bouillon Nutritif à 15% de NaCl (p/v) additionné de 25 % de glycérol (v/v). Ils sont désignés selon les codes suivants : LMB3S01, LMB3S03, LMB3S04, LMB3S15, LMB3S16, LMB3S18, LMB3S20, LMB3S23, LMB3S25, LMB3S29.

#### **I. 1. Revivification et vérification de la pureté des souches**

A partir des suspensions bactériennes conservées, 200 µL ont été inoculés dans 5 mL de Bouillon Nutritif additionné de 15 % de NaCl (p/v). Les cultures ont ensuite été incubées à 30°C jusqu'à l'apparition d'un trouble. Ensuite, Un repiquage a été effectué sur Gélose Nutritive à 15 % de NaCl (p/v) et les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 24 heures.

Afin de vérifier et d'assurer la pureté des isolats des repiquages successifs ont été réalisés, par la technique d'épuisement, sur Gélose Nutritive supplémentée de 15 % de NaCl (p/v).

Les souches pures ont été conservées à nouveau à 4°C sur Gélose Nutritive inclinée supplémentée de 15 % de NaCl (p/v), et à -20°C sur Bouillon Nutritif contenant 15% de NaCl (p/v) et 25% (v/v) de glycérol.

#### **I. 2. Présentation du site d'échantillonnage : la Grande Sebkhah d'Oran**

La Grande Sebkhah d'Oran est un lac salé situé au nord de l'Algérie, sud-ouest de la ville d'Oran, à une latitude de 35°42' Nord et longitude de 00°48' Est, et distante de 12 Km de la Mer Méditerranée. En 2002, elle a été classée comme une zone humide d'importance internationale, par la convention de Ramsar. L'eau présente dans la sebkhah. Le sel forme une couche de 10 à 30 cm d'épaisseur qui fluctue selon les précipitations et qui s'assèche entièrement pendant la saison estivale. Les sols sont principalement d'origine alluviale et ont une texture argilo-sableuse (**Benziane, 2013**). Le **tableau 3** présente les caractères physico-chimiques des échantillons d'eau de la grande sebkhah d'Oran dans la saison d'hiver.

**Tableau 3** : Caractères physico-chimiques de la grande sebkha d’Oran dans la saison hiver (Nas *et al.*, 2021).

Paramètres	Unité	Valeurs minimales	Valeurs maximales
Température	°C	16	16
pH		5.30	5.57
Conductivité C	μS cm <sup>-1</sup>	54 700	56 100
Minéralisation M	mg L <sup>-1</sup>	46 510	47 700
Salinité S	mg L <sup>-1</sup>	35 008	35 904
Cl <sup>-</sup>	mg L <sup>-1</sup>	17 500	19 200
Na <sup>+</sup> + K <sup>+</sup>	meq L <sup>-1</sup>	488.25	496.3
Dureté totale TH (Ca <sup>2+</sup> + Mg <sup>2+</sup> )	meq L <sup>-1</sup>	58.04	64.70
Ca <sup>2+</sup>	mg L <sup>-1</sup>	800	1300
Mg <sup>2+</sup>	mg L <sup>-1</sup>	40	280
HCO <sup>3-</sup>	mg L <sup>-1</sup>	09	10
CO <sub>2</sub> dissout	mg L <sup>-1</sup>	50	100

## II. Screening des activités enzymatiques extracellulaires des isolats

### II. 1. Screening sur milieu gélosé

La mise en évidence de la production des activités enzymatiques extracellulaires par les 10 isolats a été effectuée par leur ensemencement en stries et en spot sur le milieu de culture Gélose Nutritive à 15% (p/v) supplémentée de substrat à dégrader (**voir annexe**). La lecture des résultats a été réalisée après 3 jours d’incubation à 30°C.

L’évaluation qualitative des activités hydrolytiques a été effectuée par le calcul du niveau d’activité enzymatique (LEA), selon le rapport suivant :

$$\text{LEA} = \frac{\text{le diamètre de la zone d'hydrolyse (mm)}}{\text{le diamètre de la colonie bactérienne (mm)}}$$

Le niveau d’activité est considéré comme élevé lorsque le rapport est supérieur à 2, moyen lorsqu’il est compris entre 1,31-1,99, et faible lorsqu’il est inférieur à 1,3 (**Abdollahi *et al.*, 2020**).

Afin de classer les souches en fonction de leurs potentialités enzymatiques, une analyse de clustering hiérarchique a été réalisée à l’aide de la méthode de Pearson du logiciel SPSS.

#### II. 1. 1. Recherche de l’activité amylolytique

La production de l’amylase a été recherchée en ajoutant 1% (p/v) d’amidon dans le milieu de culture de base. Après incubation, les cultures sont recouvertes par une solution de Lugol. L’absence de la coloration autour de la culture indique la dégradation de l’amidon alors que les zones contenant l’amidon se colorent en brun (**Kumar *et al.*, 2012**).

## **II. 1. 2. Recherche de l'activité cellulosique**

L'activité cellulosique a été recherchée en ajoutant 1% (p/v) de cellulose dans le milieu de culture. Après incubation, les cultures sont recouvertes par une solution de Rouge Congo (1% p/v) pendant 20 minutes puis lavées par une solution de NaCl (1M) pendant 15 minutes. L'hydrolyse de la cellulose se traduit par l'apparition de zones claires autour des colonies (**Thaz et al., 2015**).

## **II. 1. 3. Recherche des activités protéasiques**

### **II. 1. 3. 1. Hydrolyse de la caséine**

La mise en évidence de l'activité protéolytique a été effectuée en additionnant 10% (p/v) de lait écrémé stérile dans le milieu de culture. L'apparition d'une auréole claire autour de la culture indique la dégradation de la caséine (**Jayachandra et al., 2012**).

### **II. 1. 3. 2. Hydrolyse de la gélatine**

Ce test a été réalisé sur un milieu gélosé contenant 1% de la gélatine, selon la méthode de **Williams et Cross (1971)**. Après incubation, les cultures sont recouvertes par une solution de chlorure de mercure (HgCl<sub>2</sub>). La dégradation de la gélatine se traduit par la présence d'une auréole claire autour des colonies.

## **II. 1. 4. Recherche des activités estérasiques**

### **II. 1. 4. 1. Hydrolyse du Tween 80**

Ce test a été réalisé par l'ajout de 1% (v/v) de Tween 80 stérilisé dans le milieu de culture. Après incubation, la dégradation du tween 80 se manifeste par l'apparition d'une auréole opaque autour de la culture (**Kumar et al., 2012**).

### **II. 1. 4. 2. Recherche de la lécithinase**

Ce test a été réalisé en ajoutant 10 mL de l'émulsion du jaune d'œuf stérile au 90 mL du milieu de culture. Après incubation, l'apparition d'une zone claire autour de la culture témoigne la production de la lécithinase par les isolats (**De Vos et al., 2009**).

## **II. 1. 5. Recherche de la lipase**

Ce test a été réalisé en ajoutant 2,5% (v/v) de l'huile d'olive stérilisée dans le milieu de culture. Après incubation, la présence de la lipase se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de la culture (**Sigurgísladóttir et al., 1993**).

## **II. 2. Recherche de la production des activités protéasiques sur milieu liquide**

Pour cette étude, les isolats qui ont démontré des niveaux d'activités protéasiques importants, dans le screening sur milieu gélosé, ont été sélectionnés afin de tester l'activité protéasique (caséinase et gélatinase) de leurs surnageants.

### **II. 2. 1. Préparation des surnageants**

Pour chaque isolat, deux à trois colonies de 24 heures à 30°C sur Gélose Nutritive supplémentée de 15% de NaCl, ont été inoculées dans 10 mL de Bouillon Nutritif à 15% de NaCl avec et sans substrats. Après 72 heures d'incubation à 30°C, chaque culture a été centrifugée à 10000 t/min pendant 30 minutes. Les différents surnageants ont été récupérés et testés pour leurs activités protéasique en utilisant la technique des puits (**Balouiri et al., 2016**).

### **II. 2. 2. La technique des puits**

Après avoir coulé la Gélose Nutritive à 15% de NaCl additionnée des différents substrats (lait écrémé et gélatine), des puits de 6 mm de diamètre ont été perforés aseptiquement en utilisant l'extrémité plate des pipettes pasteur stériles, ensuite, un volume de 50 µL de surnageant y a été introduit. La lecture des résultats est effectuée après 72 heures d'incubation à 30°C.

### **II. 2. 3. Étude de la stabilité des surnageants actifs en fonction de la température**

Les surnageants actifs ont été soumis à un traitement thermique pendant 10 minutes à différentes températures 55, 70 et 100°C. L'activité enzymatique de chaque surnageant traité a été testée par la technique des puits. La lecture des résultats est effectuée après 72 heures d'incubation à 30°C. Les activités obtenues sont comparées à celles données avec les surnageants non traités.

## **III. Caractérisation phénotypique des isolats les plus prometteurs**

### **III. 1. Caractères microscopiques**

Les caractères microscopiques des isolats ont été déterminés après 24 heures d'incubation à 30°C sur Gélose Nutritive à 15 % de NaCl.

- La mobilité a été vérifiée par un examen à l'état frais de cellules vivantes entre lame et lamelle à l'aide d'un microscope photonique à objectif 40.

- La morphologie, l'arrangement cellulaire et le type de paroi ont été déterminés après coloration de Gram. les observations sont effectuées à l'aide d'un microscope photonique à objectif 100 à immersion.

### **III. 2. Caractères macroscopiques**

Les caractères cultureux des isolats (taille, forme, pigmentation, opacité, élévation et consistance des colonies) ont été déterminés après 24 heures d'incubation à 30°C sur Gélose Nutritive à 15 % de NaCl.

### **III. 3. Croissance à différentes conditions de température, pH et salinité**

Les intervalles des différentes conditions physicochimiques (salinité, température et pH) permettant la croissance des isolats ont été déterminés sur milieu gélosé en variant une de ces conditions alors que les deux autres sont maintenues constantes. La croissance a été suivie quotidiennement durant 72 heures (**Gomri et al., 2021**).

- La gamme de salinité permettant la croissance des isolats a été recherchée en ensemençant les isolats sur GN à pH 7 contenant les concentrations en NaCl suivantes : 0, 1, 10, 15, 20, 25 et 30 % (p/v). Les cultures sont ensuite incubées à 30°C.
- L'intervalle de la température permettant la croissance a été déterminé par incubation des isolatsensemencés sur GN avec 15% de NaCl et pH 7, dans les températures suivantes 25, 30, 37, 45 et 55°C.
- L'intervalle de pH permettant la croissance a été déterminé par la culture des isolats sur GN avec 15% de NaCl ajustée à des pH de 4, 5, 6, 7, 8 et 9. L'incubation a été effectuée à 30°C.

### **III. 4. Caractères biochimiques**

La caractérisation biochimique des isolats a été réalisée par l'utilisation du système API ID32, et d'autres tests de la microbiologie classique.

#### **III. 4. 1. Recherche de la catalase**

Il s'agit de la recherche de l'enzyme responsable de l'élimination du peroxyde d'hydrogène ; la catalase. Le principe consiste à mettre en contact une colonie de l'isolat avec une goutte d'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La présence de l'enzyme se traduit par un dégagement immédiat des bulles gazeuses (**Health Protection Agency, 2011**).



### **III. 4. 2. Recherche de l'oxydase**

Le cytochrome oxydase est la dernière enzyme de la chaîne respiratoire. Elle assure le transfert des électrons sur l'oxygène ou sur un autre oxydant minéral. Sa recherche s'effectue en utilisant des disques imprégnés du réactif oxalate de N, N-diméthyl-1,4-phénylène diamine-dichlorure de couleur rose. Le principe consiste à mettre en contact une colonie avec le disque à l'aide d'une pipette pasteur. Le virage de la couleur rose du disque vers un violet noirâtre indique la présence de l'enzyme (**Public Health England, 2014**).

### **III. 4. 3. Le test Mannitol-Mobilité**

La mobilité des isolats ainsi que la fermentation du mannitol ont été déterminées sur le milieu semi solide de Mannitol-Mobilité. Les isolats ont été ensemencés par piqûre centrale. Après 24 d'incubation à 30°C, l'utilisation du mannitol se traduit par un virage de la couleur du milieu, du rouge au jaune et la mobilité est révélée par l'envahissement du milieu à partir de la piqûre d'inoculation (**Harley et Prescott, 2002**).

### **III. 4. 4. Recherche du type respiratoire**

La mise en évidence du type respiratoire des isolats a été réalisée selon le protocole de **Guiraud (1998)**, sur une gélose profonde viande foie (VF) coulée dans des tubes. L'ensemencement a été effectué à l'aide d'une pipette pasteur par transportation d'inoculum dans le fond du tube en surfusion (45°C), puis remontée en décrivant une spire, de façon à ensemencer uniformément le milieu. Après refroidissement et solidification du milieu, les cultures sont incubées à 30°C pendant 72 heures. Les bactéries aérobies strictes se développent uniquement dans la zone superficielle tandis que les aéro-anaérobies facultatives se développent sur la totalité du tube.

### **III. 4. 5. Le système API ID32**

Les galeries API ID32 constitue un système simplifié et standardisé, elles comportent des 32 microtubes contenant des substrats déshydratés permettant d'étudier les profils biochimiques des isolats (**voir annexe**).

Une suspension d'opacité de 0.5 McFarland ( $DO_{590\text{ nm}} = 0.1$ ) pour chaque isolat a été effectuée sur eau physiologique à partir d'une culture de 24 heures sur GN à 15% de NaCl (p/v).

Après inoculation, les galeries sont incubées pendant 24 heures à 30°C, les réactions se traduisent par des virages colorés spontanés. L'interprétation des résultats se réfère au catalogue joint avec la plaque (**voir annexe**).

### **III. 4. 6. Étude du profil de sensibilité des isolats aux antibiotiques**

Le profil de sensibilité des isolats aux antibiotiques a été déterminé, en utilisant la technique de diffusion des disques sur la gélose Müeller-Hinton pour l'isolat LMB3S04 et sur la gélose Müeller-Hinton additionnée de 15% de NaCl selon le protocole de **Bagheri et al. (2012)** pour l'isolat LMB3S25.

Six antibiotiques de différentes classes ont été utilisés : la fosfomycine (50µg), la tetracycline (30µg), la kanamycine (30µg), l'amoxicilline (13µg), la streptomycine (10µg) et l'ampicilline (10µg).

A partir de cultures 24 heures à 30 °C sur GN à 15 % de NaCl (p/v), des suspensions de turbidité équivalente à 0,5 McFarland ont été préparées dans de Bouillon Nutritif à 15% de NaCl, puis ensemencées par écouvillonnage sur les boites contenant le Müeller-Hinton. Enfin, les disques d'antibiotiques ont été appliqués sur la gélose à l'aide d'une pince stérile.

Après 24 heures d'incubation à 30°C, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et la classification des isolats comme intermédiaires, résistants ou sensibles aux antibiotiques a été effectuée en accord avec les interprétations données par **CA-SFM (2023)**.

# **Résultats et discussion**

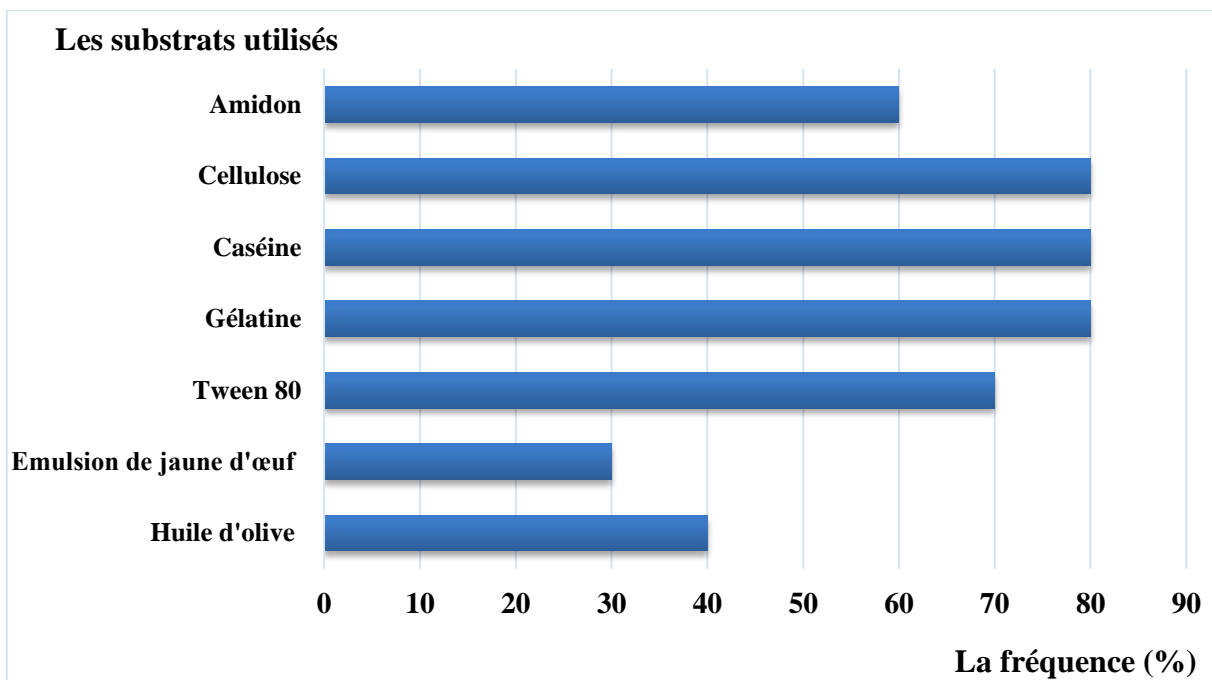
## **I. Screening des activités enzymatiques extracellulaires des isolats**

### **I. 1. Résultats**

#### **I. 1. 1. Recherche de la production des activités enzymatiques extracellulaires sur milieu gélosé**

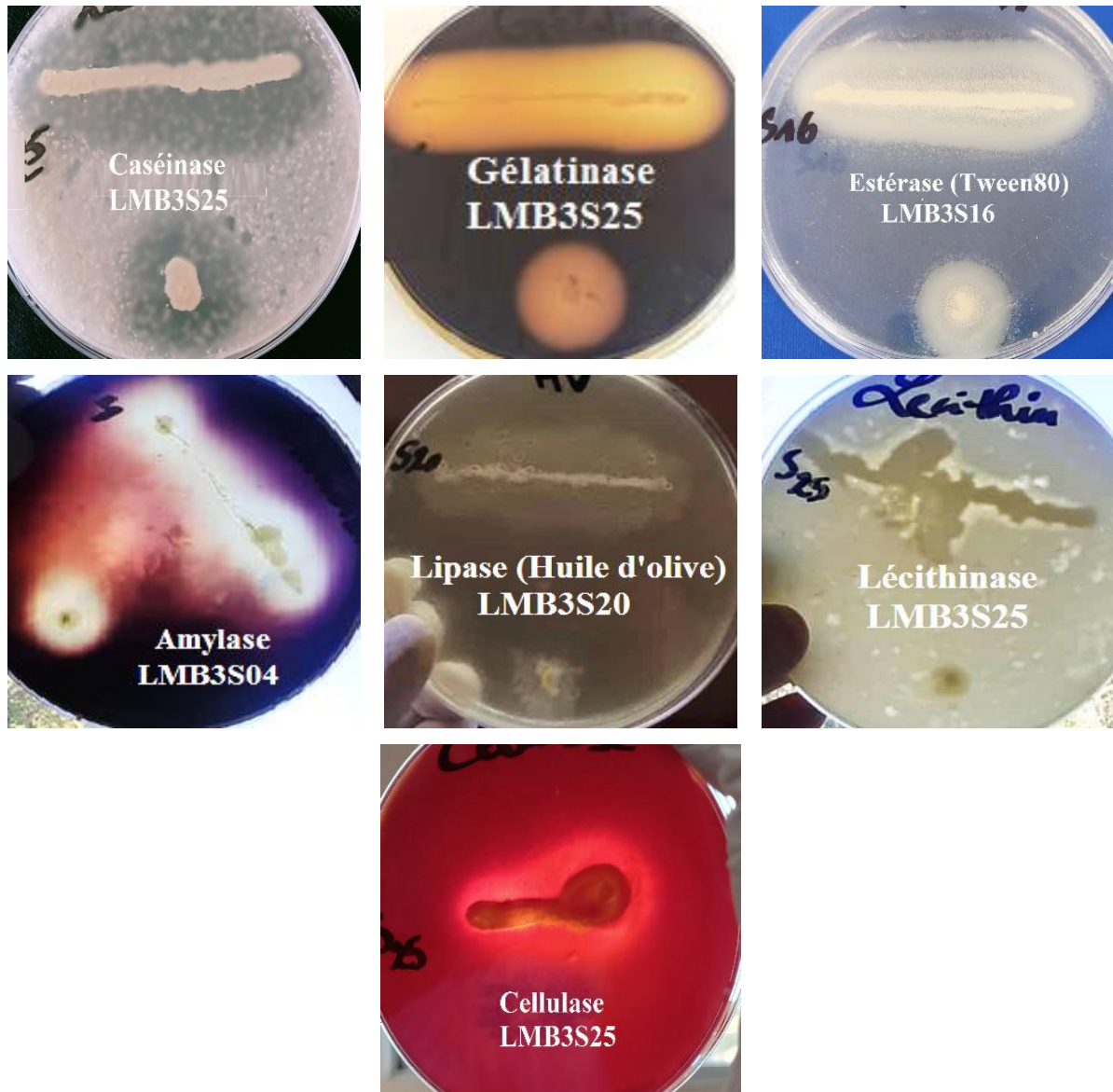
Après la revivification et la vérification de la pureté des 10 isolats sur milieu Gélose Nutritive à 15% de NaCl, leur potentiel de production des enzymes hydrolytiques extracellulaires a été évalué sur le milieu de base Gélose Nutritive à 15 % de NaCl enrichi avec les substrats : l'amidon, la caséine, l'émulsion de jaune d'œuf, la cellulose, le Tween 80 et l'huile d'olive pour détecter respectivement la production des enzymes suivantes : l'amylase, la protéase, la lécithinase, la cellulase, l'estérase et la lipase.

Les résultats obtenus montrent que tous les isolats, à l'exception de l'isolat LMB3S29, sont capables d'hydrolyser au moins quatre (4) substrats avec une dominance des activités gélatinase, cellulase et caséinase. Les fréquences des isolats producteurs d'activités hydrolytiques pour chaque substrat sont présentées dans **la figure 1**.



**Figure 1** : Fréquences (%) d'isolats producteurs des activités hydrolytiques pour chaque substrat.

Les photos dans **la figure 2** montrent des exemples de résultats d'hydrolyses des substrats après 72 heures d'incubation à 30°C.



**Figure 2** : Photos des résultats du screening des activités enzymatiques sur milieu gélosé de certains isolats.

Ce test a également permis d'obtenir une estimation quantitative des activités enzymatiques produites par les isolats en calculant les niveaux d'activités enzymatiques (LEA). Ces niveaux sont déterminés par le rapport entre les diamètres des colonies et ceux des zones d'hydrolyse générées par chaque isolat. Selon **Abdollahi et al. (2020)**, le niveau d'activité est considéré comme élevé lorsque le rapport est supérieur à 2, moyen lorsqu'il est compris entre 1,31-1,99, et faible lorsqu'il est inférieur à 1,3.

Les résultats des LEA obtenus sont résumés dans le **tableau 4**.

**Tableau 4:** Les niveaux des activités enzymatiques (LEA) obtenus pour chaque isolat.

	Amylase	Caséinase	Lécithinase	Tween 80	Huile d'olive	Cellulase	Gélatinase
LMB3S01	1,78	2,5	-	1,18	2,5	1,3	0,28
LMB3S03	-	2,16	1,66	1,02	-	2	-
LMB3S04	3,14	4,83	1,75	3	3,3	1,2	3,85
LMB3S15	-	1,75	-	2,42	-	2,2	3
LMB3S16	-	1,5	-	3,4	-	4,25	3,02
LMB3S18	3	3	-	-	-	4	3
LMB3S20	1,4	-	-	-	6	2	3,5
LMB3S23	2,28	1,20	-	1,25	-	-	1,25
LMB3S25	2,5	4,98	2,78	3,5	1,02	2,6	4,25
LMB3S29	-	-	-	-	-	-	-

<span style="background-color: #FFD700; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> Niveau LEA élevé	<span style="background-color: #FFC080; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> Niveau LEA moyen	<span style="background-color: #FFDAB9; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> Niveau LEA faible	<span style="background-color: #E0E0E0; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> Absence d'activité
--	--	---	--

Les données des LEA obtenu ont ensuite été analysées par le logiciel SPSS. Cela a permis de générer un clustering hiérarchique, à l'aide de la méthode de Pearson, en fonction de l'importance de leur pouvoir enzymatique qui a été classé en 4 catégories : **aucun (0), faible (1), moyen (2) et élevé (3)**. Les résultats ont montré que les isolats se répartissent en cinq (5) clusters. Chaque cluster regroupe des isolats présentant des activités enzymatiques plus ou moins similaires (**Tableau 5 ; Figure 3**).

**Tableau 5 :** Clustering des isolats et classification de leur pouvoir enzymatique

	Amylase	Protéase	Lécithinase	Tween 80	Huile d'olive	Cellulase	Gélatinase	Cluster (groupes)
LMB3S01	1	2	0	1	2	1	1	1
LMB3S04	2	2	0	2	2	0	3	1
LMB3S03	0	2	1	1	0	2	0	2
LMB3S25	3	2	1	0	0	2	2	2
LMB3S15	0	1	0	2	0	2	3	2
LMB3S16	0	1	0	2	0	3	3	2
LMB3S18	2	2	0	2	0	3	3	2
LMB3S20	1	0	0	0	3	2	3	3
LMB3S23	3	1	0	1	0	0	1	4
LMB3S29	0	0	0	0	0	0	0	5

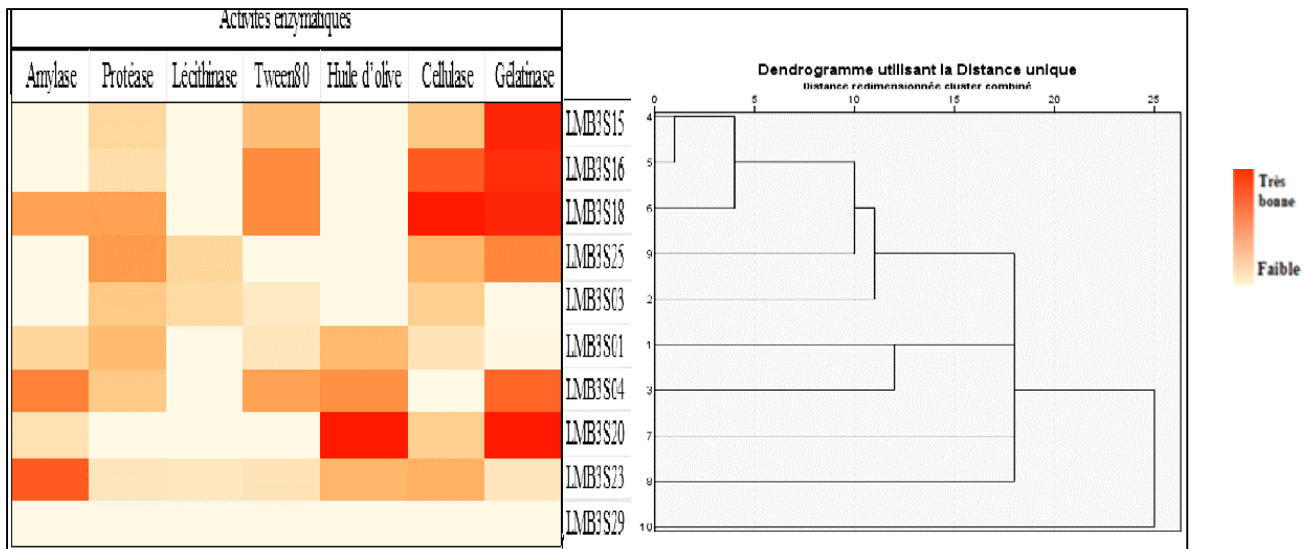


Figure 3 : Heatmap avec dendrogramme représentant les clusters et les activités enzymatiques des isolats.

### I. 1. 2. Recherche de la production des activités protéasiques sur milieu liquide

D'après les résultats du criblage primaire des activités enzymatiques sur milieu gélosé, deux isolats, LMB3S04 et LMB3S25, ont été sélectionnés pour leurs niveaux LEA d'activité protéasiques élevés.

Leur pouvoir hydrolytique a été testé vis-à-vis la caséine et la gélatine. Après une fermentation pendant 72 heures à 30°C sur milieu liquide (Bouillon Nutritif à 15% de NaCl) sans substrat, ainsi que dans le même milieu supplémenté séparément avec de la caséine et de la gélatine, les cultures ont subi une centrifugation à 10000 t/min pendant 30 minutes. Les différents surnageants obtenus ont été ensuite récupérés et testés pour leurs activités protéolytiques en utilisant la technique des puits.

Quant au surnageants obtenus à partir des cultures sur les milieux sans caséine et sans gélatine aucune activité enzymatique n'a été enregistrée.

Pour les cultures additionnées de la gélatine, les surnageant des isolats n'ont exercé aucune activité protéolytique.

Pour les cultures additionnées de caséine, le surnageant de l'isolat LMB3S04 n'a exercé aucune activité protéolytique, En revanche, le surnageant de l'isolat LMB3S25 a montré une activité protéasique importante (**Figure 4**) avec un diamètre d'hydrolyse de 21 mm et un niveau LEA de 3,5.



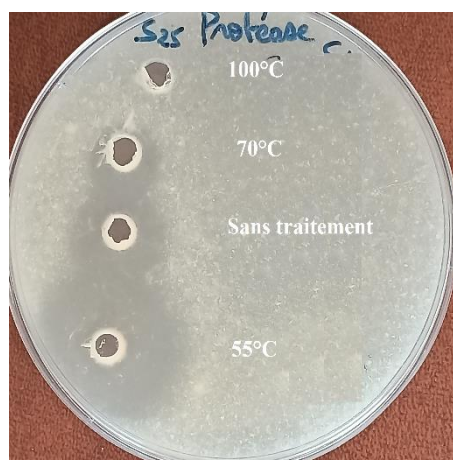
**Figure 4 :** Photo du résultat de l'activité protéasique des surnageants des isolats sélectionnés inoculés sur BN à 15% de NaCl additionné de caséine

### I. 1. 3. Étude de la stabilité thermique des surnageants actifs

Pour cette étude, le surnageant de l'isolat LMB3S25, qui a démontré une activité protéasique, a été sélectionné pour subir un traitement thermique à des températures de 55°C, 70°C et 100°C pendant 10 minutes. Les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau 6** et la **figure 5**.

**Tableau 6 :** Diamètres des zones d'hydrolyse et les LEA de l'activité protéasique du surnageant de l'isolat LMB3S25 avant et après traitement thermique

	Caséinase (sans traitement)	Caséinase à 55 C°	Caséinase à 70C°	Caséinase à 100C°
<b>Diamètres d'hydrolyse</b>	<b>21 mm</b>	<b>29 mm</b>	<b>14 mm</b>	<b>-</b>
<b>L. E. A.</b>	<b>3.5</b>	<b>4.83</b>	<b>2.33</b>	<b>-</b>



**Figure 5 :** Résultats de l'activité protéasique des surnageants de l'isolat LMB3S25 après les différents traitements thermiques (55, 70 et 100°C pendant 10 minutes).



À partir des résultats obtenus, il apparaît que l'activité protéasique (caséinase) du surnageant de l'isolat LMB3S25 a augmenté à la température de 55°C. À 70°C l'activité protéasique a diminué. À 100°C, une inactivation complète de cette activité est enregistrée.

### **I. 2. Discussion**

Dans cette première partie de notre mémoire, nous avons effectué un criblage des enzymes hydrolytiques extracellulaires (amylase, caséinase, gélatinase, lécithinase, cellulase, estérases et lipases) de dix isolats provenant de la grande sebkha d'Oran.

Les activités enzymatiques ont été recherchées dans un premier temps sur milieu gélosé à 15% de NaCl, à pH égale 6 et à 30°C. Les résultats obtenus ont montré un pouvoir hydrolytique important chez les isolats étudiés, ils étaient capables de produire au moins 4 enzymes, à l'exception d'un seul isolat, le LMB3S29, qui n'a exercé aucun effet hydrolytique vis-à-vis les substrats utilisés.

De nombreux taxons microbiens halophiles et halotolérants isolés des habitats salins algériens ont été rapportés comme de bons producteurs de puissantes hydrolases, incluant les protéases, lipases, cellulases, pectinases, estérases et inulinases (**Quadri et al., 2016 ; Menasria et al., 2018, Saibi et al., 2022**).

La caséinase, gélatinase et la cellulase sont les activités les plus répandues chez nos isolats. Elles sont produites par 80% d'isolats, suivie par l'estérase capables d'hydrolyser le Tween 80, produites par 70% d'isolats, et l'amylase, produite par 60%. **Kharroub et al. (2014)**, ont observé une abondance de l'activité amylolytique chez des *Archaea* halophiles isolées de différents écosystèmes algériens. Dans leurs études, **Menasria et al. (2018 et 2019)** ont trouvé que la gélatinase, l'estérase, la cellulase et l'amylase étaient les plus produites chez des bactéries et archées issues de divers habitats salins situés dans le Sahara algérien.

La capacité de produire simultanément plusieurs enzymes, est une propriété particulièrement intéressante chez nos isolats. Selon **Purohit et al. (2016)**, cette co-production confère une grande stabilité aux microorganismes. **Hmidet et al. (2009)**, ont observé une stabilité significative aux agents tensioactifs, oxydants et à divers détergents d'une amylase et protéase co-produites par *Bacillus licheniformis* NH1.

La production des enzymes par nos isolats a été effectuée à une concentration de 15% de NaCl. Ce constat permet de considérer ces enzymes comme des extrêmoenzymes conformément à la définition de **Gomes et Steiner (2004)**, et souligne l'importance de ces enzymes dans les processus biotechnologiques nécessitant la présence de fortes concentrations

en sels, qui pourraient inhiber l'activité de la majorité des autres enzymes (**Ruginescu et al., 2020**).

Les isolats LMB3S04 et LMB3S25 se révèlent être les plus prometteurs, présentant le spectre d'activités hydrolytiques le plus étendu. Ils ont démontré la capacité d'hydrolyser tous les substrats testés avec des niveaux d'activité enzymatique (LEA) significatifs. En conséquence, ces isolats ont été sélectionnés pour étudier leur capacités de produire des protéases (caséinase et gélatinase) en milieu liquide (Bouillon Nutritif à 15% de NaCl), tant en absence qu'en présence de substrats spécifiques. Après une fermentation pendant 72 heures à 30°C suivie d'une centrifugation à 10000 t/min pendant 30 minutes. Les surnageants obtenus ont été testés pour les activités caséinase et gélatinase. Les résultats ont indiqués une absence totale des activités caséinase et gélatinase dans les surnageants obtenus des cultures sans caséine ni de gélatine, ainsi que dans ceux des cultures supplémentées en gélatine. De plus, aucune activité caséinase n'a été détectée dans le surnageant de l'isolat LMB3S04 supplémenté en caséine. En revanche, le surnageant de l'isolat LMB3S25, induit par la caséine, a démontré une activité caséinase notable, avec un diamètre de zone d'hydrolyse de 21 mm et un niveau d'activité enzymatique (LEA) de 3,5.

L'absence des activités protéasiques dans les cultures exemptes de substrats, peut être expliqué par le faite que la production de ces enzymes est souvent inductible et régulée par la disponibilité des substrats qui stimulent leur production (**Singh et al., 2016**).

Quant à l'absence des activités gélatinase et caséinase dans les surnageants malgré la présence des substrats, plusieurs hypothèse peuvent être formulées. Cela pourrait résulter

- D'une induction insuffisante, dont l'isolat pourrait nécessiter des conditions spécifiques ou une concentration particulière du substrat qui stimule efficacement l'expression de l'enzyme. En l'absence de conditions optimales, l'enzyme peut ne pas être produite ou être produite en quantités insuffisantes.
- Une sécrétion inefficace de l'enzyme dans le milieu extracellulaire malgré sa production
- La présence d'autres sources plus facilement métabolisables, ce qui peut réprimer la production de l'enzyme ou empêcher son expression (phénomène de répression catabolique).
- La présence dans le milieu de substances inhibitrices qui pourraient être des composés présents dans le milieu ou produits par l'isolat lui-même.

## ***Résultats et discussion***

Le surnagent, de l'isolat LMB3S25, exhibant une activité caséinase, a été soumis à un traitement thermique à des températures de 55, 70 et 100°C pendant 10 minutes. Les résultats ont révélé une augmentation intéressante de l'activité caséinase du surnagent traité à 55°C par rapport à son niveau initial. À 70°C, une diminution de l'activité enzymatique a été observée, et à 100°C l'activité caséinase a complètement disparu.

L'augmentation de l'activité caséinase à 55 °C peut être issue d'une activation ou d'une meilleure accessibilité des sites actifs de l'enzyme. Cependant, à 70°C et surtout à 100°C, la structure de l'enzyme peut être inhibée ou dénaturée complètement. Un résultat similaire a été rapporté par **Yang *et al.* (2020)**, où ils ont étudié la stabilité thermique d'une laccase et ont montré que l'activité enzymatique peut augmenter avec la température jusqu'à un certain point, atteignant un maximum à 60°C.

## **II. Caractérisation phénotypique des isolats les plus prometteurs**

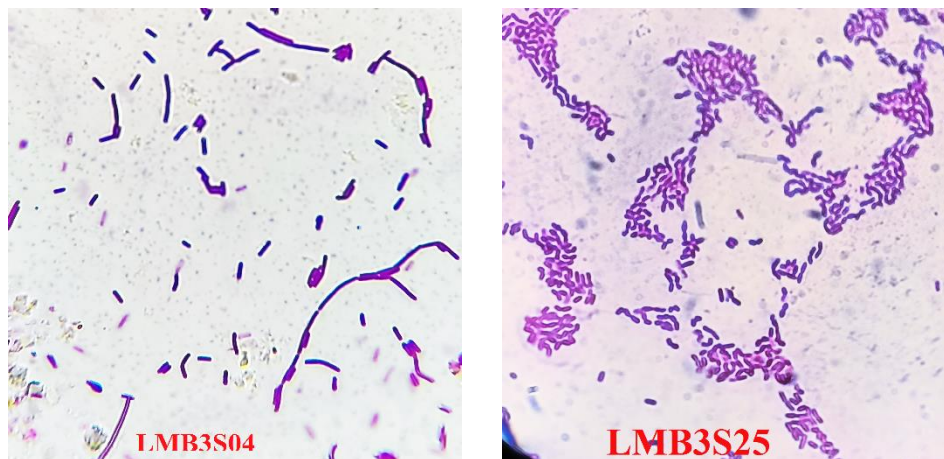
### **II. 1. Résultats**

Les deux isolats LMB3S04 et LMB3S25 ont été sélectionnés pour faire l'objet d'une caractérisation phénotypique.

#### **II. 1. 1. Caractérisation microscopique**

Les caractères microscopiques des isolats ont été déterminés après 24 heures d'incubation à 30°C sur Gélose Nutritive à 15% de NaCl. L'observation de l'état frais a mis en évidence le caractère mobilité des isolats. L'examen microscopique après coloration de Gram a révélé que les isolats possèdent un type de paroi à Gram positif.

Les cellules de l'isolat LMB3S04 se présentent sous forme de bâtonnets isolés ou formant de chainettes. Les cellules de l'isolat LMB3S25 sont des coco-bacilles regroupés en amas (Figure 6).



**Figure 6** : Photos des résultats de la coloration de Gram des isolats après 24 heures d'incubation sur GN à 15% de NaCl à 30°C (microscope photonique à objectif 100 à immersion).

#### **II. 1. 2. Caractérisation macroscopique**

Après ensemencement des isolats sur milieu GN à 15 % de NaCl, les colonies apparaissent après 24 heures d'incubation à 30°C. Les colonies de l'isolat LMB3S04 sont circulaires de 3 à 4 mm de diamètre et de couleur beige. Leur surface est plate, lisse et brillante avec un contour irrégulier, translucide avec une consistance muqueuse. Elles sont non odorantes. En dépassant les 24 heures d'incubation, elles deviennent sèches et collantes à la gélose avec une couleur blanche, Non odorantes. Quant à l'isolat LMB3S25, les colonies sont très petites de 2 mm de diamètre, opaques de couleur beige avec une surface bombée, lisse et brillante à contour régulier et à consistance muqueuse. Elles ne dégagent aucune odeur (Figure 7).



**Figure 7** : Photos des aspects macroscopiques des isolats après 24 heures d’incubation sur GN à 15% de NaCl à 30°C.

### II. 1. 3. Caractérisation physiologique

La caractérisation physiologique des isolats a été déterminée en suivant quotidiennement leur croissance durant 72 heures sur milieu gélosé (Gélose Nutritive) à différents paramètres de salinité, de température et de pH. Les différents résultats de cette étude sont mentionnés dans le **tableau 7**.

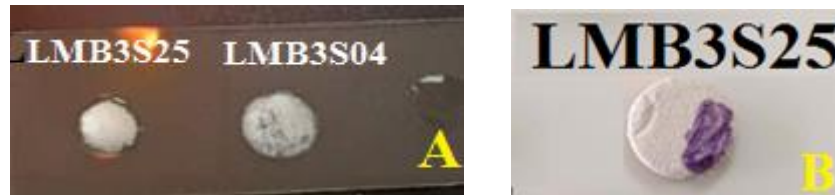
**Tableau 7** : Intervalles de salinité, de température et de pH permettant la croissance des isolats.

Isolats	LMB3S04	LMB3S25
<b>Paramètres de croissance</b>		
<b>Concentration de NaCl (%)</b>	<b>0 à 20%</b>	<b>1 à 30%</b>
<b>Optimum de concentration de NaCl de croissance</b>	<b>10 à 15%</b>	<b>15 %</b>
<b>Température (°C)</b>	<b>25 à 55°C</b>	<b>25 à 55°C</b>
<b>Optimum de température de croissance</b>	<b>30 - 37°C</b>	<b>30 - 55°C</b>
<b>pH</b>	<b>5 à 8</b>	<b>5 à 9</b>
<b>Optimum de pH de croissance</b>	<b>6 - 7</b>	<b>7 - 9</b>

### II. 1. 4. Caractérisation biochimique

Les propriétés métaboliques et le profil biochimique des isolats ont été caractérisés par la galerie API ID32 et les tests de la recherche de la catalase, le cytochrome oxydase, le type respiratoire sur milieu Viande Foie (VF) et la mobilité sur le milieu Mannitol-Mobilité.

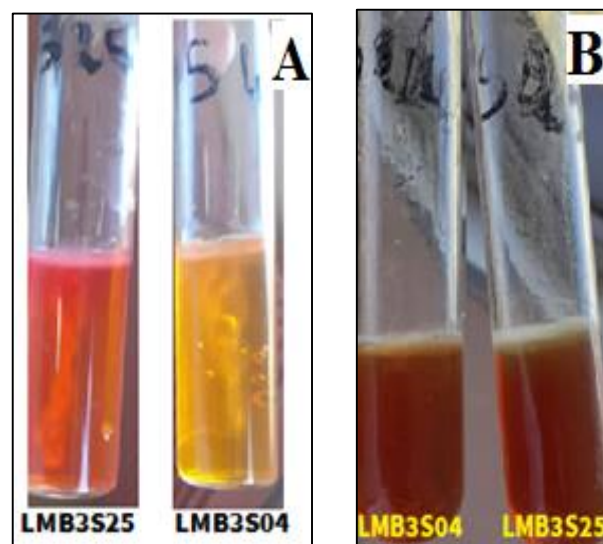
La recherche des enzymes respiratoires des isolats, a révélé la présence de la catalase et le cytochrome oxydase chez les deux isolats (**Figure 8**).



**Figure 8** : Photos de résultats du test catalase (A) et Oxydase (B) des isolats

Concernant le test Mannitol-Mobilité, la fermentation du mannitol a été observée uniquement chez l'isolat LMB3S04, elle s'est traduite par le virage de la couleur rouge de l'indicateur à la couleur jaune. En ce qui concerne la mobilité, les deux isolats ont envahi le milieu à partir de la pique centrale, ce qui indique qu'ils sont mobiles. Les résultats sont démontrés dans la **figure 9**.

La culture des isolats sur le milieu VF a montré qu'elles se développent uniquement dans la zone superficielle. Il s'agit de bactéries aérobies strictes (**Figure 9**).



**Figure 9** : Photos des résultats du test Mannitol-Mobilité (A) et type respiratoire (B)

Les résultats obtenus pour la caractérisation biochimique des isolats LMB3S04 et LMB3S25 par le système ID32 sont récapitulé dans le **tableau 8** et la **figure 10**.

**Tableau 8** : Propriétés métaboliques des isolats mis en évidence par la galerie ID32

Caractère	LMB3S04	LMB3S25	Caractères	LMB3S04	LMB3S25
ODC	-	-	IND	-	-
ADH	-	-	$\beta$ NAG	-	-
LDC	-	-	$\beta$ GAL	+	-
URE	+	-	GLU	+	+
LARL	-	-	SAC	+	+
GAT	-	-	LARA	+	+
5KG	-	+	DAL	+	+
LIP	+	-	$\alpha$ GLU	+	+
RP	-	-	$\alpha$ GAL	+	+
$\beta$ GLU	+	-	TRE	-	+
MAN	+	-	RHA	+	-
MAL	+	-	INO	+	-
ADO	+	-	CEL	+	-
PLE	+	-	SOR	+	-
$\beta$ GUR	+	+	$\alpha$ MAL	+	+
MNT	-	-	AspA	+	+



**Figure 10** : Photos des résultats de la caractérisation biochimiques des isolats par le système ID32 après 24 heures d'incubation à 30°C.

### II. 1. 5. Étude du profil de sensibilité des isolats aux antibiotiques

La sensibilité des isolats a été testée sur la gélose Muller Hinton pour l'isolat LMB3S04 et à gélose Muller Hinton à 15% de NaCl pour l'isolat LMB3S25 selon le protocole de **Bagheri et al. (2012)**. Les résultats obtenus, après comparaisons des diamètres des zones d'inhibition observés avec les valeurs critiques données par **CA-SFM (2023)**, sont présentés dans le **tableau 9**.

**Tableau 9:** Résultats de l'étude de la sensibilité des isolats aux antibiotiques.

Isolats	LMB3S04	LMB3S25
<b>Antibiotiques</b>		
<b>Amoxicilline</b>	Résistant	Sensible
<b>Vancomycine</b>	Résistant	Résistant
<b>Fosfomycine</b>	Résistant	Résistant
<b>Kanamycine</b>	Sensible	Sensible
<b>Tobramycine</b>	Sensible	Résistant

### II. 2. Discussion

Dans cette partie, nous avons procédé à la caractérisation phénotypique des isolats LMB3S04 et LMB3S25 conformément aux recommandations de **Logan et al. (2009)** pour la description de nouveaux taxons aérobies.

La caractérisation a débuté par des examens microscopiques réalisés à l'état frais et après coloration de Gram. L'observation à l'état frais a révélé la mobilité des isolats, confirmée par la culture sur milieu Mannitol-Mobilité.

L'étude microscopique, après coloration de Gram, a montré que les cellules des isolats étaient des bâtonnets à Gram positif de tailles variés, disposées soit sous forme de cellules isolées ou en chaînettes pour l'isolat LMB3S04, soit en amas pour l'isolat LMB3S25. La majorité des études portant sur l'isolement des bactéries à partir d'habitats salins révèlent une dominance de bactéries à Gram positif (**Klouche Khelil et al., 2013, DasSarma et DasSarma, 2015 ; Nas et al., 2021, Saibi et al., 2022**).

L'étude de la croissance des isolats à différentes concentrations de NaCl a été menée sur un intervalle de 0 à 30%. L'isolat LMB3S04 a montré une capacité de croissance en l'absence de NaCl ainsi qu'à une concentration de 20%, avec un optimum de croissance entre 10 et 15%. L'isolat LMB3S25 n'a présenté aucune croissance à 0% de NaCl, indiquant une nécessité absolue de sel pour sa croissance. Il a démontré une croissance à une concentration de 30% de NaCl (point de saturation), avec un optimum à 15%. Selon la classification de **Rahman et al.**



(2017), ces isolats peuvent être classés respectivement comme halotolérant modéré et halophile extrême.

L'intervalle de température de croissance des isolats s'étend de 25 à 55°C, avec un optimum observé entre 30 à 37°C pour l'isolat LMB3S04, et entre 30 et 55°C pour l'isolat LMB3S25. Selon **Bowers et al. (2009)**, ces caractéristiques permettent de les classer dans la catégorie des bactéries thermo-tolérantes.

L'évaluation de la croissance à différents pH a révélé une croissance optimale à des pH neutres et légèrement alcalins. Ce profil correspond à celui des espèces alcali-tolérantes qui présentent une croissance optimale près de la neutralité tout en tolérant des pH alcalins (**Bowers et al., 2009**).

Les microorganismes halophiles et halotolérants peuvent tolérer une large gamme de pH, se développant aussi bien dans des conditions acides qu'alcalins. Cette tolérance est rendue possible par divers mécanismes d'adaptation à l'acidité, tels que l'accumulation de solutés compatibles et de protons H<sup>+</sup> (**Lewinson et al., 2004**). Ce qui peut expliquer la tolérance de nos isolats à un pH acide égal à 5.

Les caractéristiques métaboliques des isolats ont été déterminées à l'aide du système miniaturisé API ID 32. Cette galerie présente un intérêt particulier pour établir les profils biochimiques des espèces bactériennes. Elle permet une caractérisation rapide et précise par l'analyser d'un large éventail de réactions enzymatiques et métaboliques, facilitant ainsi leur classification et leur étude fonctionnelle. Plusieurs enzymes ont été mises en évidence chez les isolats,  $\beta$ -Glucuronidase,  $\alpha$ -Glucosidase,  $\alpha$ -Galactosidase et  $\alpha$ -Maltosidasen ces enzymes jouent des rôles essentiels dans divers processus biotechnologiques.

La  $\beta$ -Glucuronidase est utilisée en industrie pharmaceutique dans la production de médicaments et la détoxification de composés chimiques (**Alagarsamy et Vijayakumar, 2020**).

L'  $\alpha$ -Glucosidase : est utilisée en industrie alimentaire pour convertir l'amidon en glucose, et joue un rôle dans la production de bioéthanol à partir de matières premières végétales (**Jin et Sun, 2022**).

L'  $\alpha$ -Galactosidase es utilisée pour décomposer les oligosaccharides dans les aliments, réduisant ainsi les ballonnements et les gaz intestinaux (**Guo et al., 2020**).

L'  $\alpha$ -Maltosidase (Maltase) : Utilisée pour convertir le maltose en glucose dans la production de sirop de glucose, et joue un rôle crucial dans la fermentation des levures pour la production des produits fermentés (**Han et al., 2020**).

## ***Résultats et discussion***

La sensibilité des isolats aux antibiotiques a été évaluée en utilisant la gélose Muller-Hinton pour l'isolat LMB3S04. Pour l'isolat LMB3S25, en raison de sa nécessité en NaCl pour sa croissance avec un optimum à 15%, la gélose Muller-Hinton a été supplémentée avec 15% de NaCl. Les deux isolats ont montré une résistance à la Vancomycine et la Fosfomycine, et une sensibilité à la Kanamycine.

Dans leur étude, **Nas *et al.* (2021)**, ont analysé le profil de résistance des isolats prélevés de la grande sebkha d'Oran, ils ont constaté que ces isolats présentaient une résistance à la fosfomycine mais étaient sensibles à la vancomycine et la kanamycine.

En ce qui concerne l'Amoxicilline, l'isolat LMB3S25 s'est révélé sensible, résultat identique à ceux rapportés par **Nas *et al.* (2021)** et **Saibi *et al.* (2022)**. En revanche l'isolat LMBS04 a montré une résistance à cet antibiotique.

# **Conclusion et perspectives**

## *Conclusion et perspectives*

L'objectif principal de ce travail était de réaliser un criblage des enzymes hydrolytiques d'intérêt biotechnologique (amylase, caséinase, gélatinase, lipase et estérases) à partir d'un ensemble de dix (10) souches bactériennes isolées de la grande sebkha d'Oran.

Dans un premier temps, la production des activités enzymatiques a été évaluée sur milieu gélosé contenant 15% de NaCl et supplémenté des substrats d'intérêt. Sur les 10 isolats, neuf (9) isolats ont montré des activités hydrolytiques vis-à-vis au moins 4 substrats utilisés. Une dominance des activités protéasiques et cellulolique a été constatée chez les isolats.

En se basant sur les niveaux d'activités enzymatiques observés, deux isolats ont été choisis LMB3S04 et LMB3S25. Leurs surnagants ont été utilisés pour étudier la production de protéases en milieu liquide. Cette recherche a impliqué l'analyse des surnagants induits par la présence des substrats (caséine et gélatine), ainsi que des surnageants non induits.

Seulement le surnagent de l'isolat LMB3S25 induit par la présence de caséine a montré une activité protéasique significative. Il a été soumis à une étude de thermo-stabilité à des températures de 55°C, 70°C et 100°C. Une activation de la caséinase a été observée à 55°C, suivie d'une diminution de l'activité à 70°C et d'une disparition totale à 100°C.

Les deux isolats choisis ont fait l'objet d'une identification phénotypique par des techniques de la microbiologie classique et par le système API ID32. Ils se présentent sous forme de bâtonnets à Gram positif, aérobies stricte, mobiles et possédant la catalase et l'oxydase. La galerie API ID 32 a mis en évidence un pouvoir métabolique important et un bagage enzymatique intéressant.

L'étude de la tolérance au NaCl a permis d'assigner l'isolat LMB3S04 à la catégorie des bactéries modérément halotolérantes capables de se développer dans des milieux sans NaCl et de tolérer des concentrations de NaCl allant jusqu'à 20 %, et l'isolat LMB3S25 à la catégories des bactéries halophiles extrêmes comme il exige du sel pour sa croissance et tolère jusqu'à 30%. Ces isolats présentent également des profils thermotolérants et alcalitolérants.

Vu les résultats obtenus et les hypothèses formulés sur l'absence d'activités enzymatiques dans le milieu liquide malgré leur expression sur milieu gélosé, il serait particulièrement intéressant de mener une étude approfondie pour déterminer les conditions optimales de production, les limites physiologiques de l'excrétion de ces enzymes, ainsi que les paramètres de culture pouvant influencer l'activité enzymatique

De plus, il serait pertinent d'envisager l'extraction et la purification de ces enzymes en vue d'applications potentielles dans l'industrie.

## *Conclusion et perspectives*

Les résultats de l'étude de la stabilité thermique des surnagents actifs nous motivent à entreprendre la modélisation de la thermoactivation de ces activités.

Les résultats nous encouragent également à poursuivre l'identification de ces isolats par l'analyse de la séquence complète du gène ARNr 16S.

Un autre intérêt, est de rechercher d'autres potentiels biotechnologiques chez ces isolats tels que la production des biosurfactants ou la stimulation de la croissance végétale. Ils peuvent constituer des candidats prometteurs comme agents de bio-contrôle et des outils écologiques de bioremédiation.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

1. **Abaramak, G., Kirtel, O., & Öner, E. T. (2020).** Fructanogenic halophiles: A new perspective on extremophiles. In: Salwan, Sharma (eds) *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles. Academic Press.* 123-130. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00009-5>.
2. **Abdallah, M. B., Karray, F., Mhiri, N., Mei, N., Quéméneur, M., Cayol, J. L., Erauso, G., Tholozan, J. L., Alazard, D., & Sayadi, S. (2016).** Prokaryotic diversity in a Tunisian hypersaline lake, Chott El Jerid. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 20 (2), 125–138. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0805-7>.
3. **Abdollahi, P., Ghane, M., & Babaeekhou, L. (2020).** Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Gavmesh Goli Hot Spring in Sabalan Geothermal Field, Iran: *Thermomonas hydrothermalis* and *Bacillus altitudinis* Isolates as a Potential Source of Thermostable Protease. *Geomicrobiology Journal*, 38(1), 87–95. <https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1812774>.
4. **Ahmad, W., Tayyab, M., Aftab, M. N., Hashmi, A. S., Ahmad, M. D., Firyal, S., & Awan, A. R. (2020).** Optimization of conditions for the higher-level production of protease: Characterization of protease from *Geobacillus* SBS-4S. *Waste and Biomass Valorization*, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-00935-4>.
5. **Akpolat, C., Fernández, A. B., Caglayan, P., Calli, B., Birbir, M., & Ventosa, A. (2021).** Prokaryotic communities in the Thalassohaline Tuz Lake, deep zone, and Kayacik, Kaldirim and Yavsan Salterns (Turkey) assessed by 16S rRNA amplicon sequencing. *Microorganisms*, 9 (7), 1525. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071525>.
6. **Alagarsamy, S., & Vijayakumar, P. (2020).** Applications of  $\beta$ -glucuronidase in the food industry: An overview. *Journal of Food Science and Technology*, 57 (9), 3289-3297. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04454-2>.
7. **Aljohny, B. O. (2015).** Halophilic Bacterium - A Review of New Studies. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 12 (3), 2061-2069. <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/1874>.
8. **Bagheri, M., Didari, M., Amoozegar, M.A., Schumann, P., Sanchez-Porro, C., Mehrshad, M., & Ventosa, A. (2012).** *Bacillus iranensis* sp. nov., a moderate halophile from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62 (4), 811-816. <https://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.030874-0>.

9. **Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016).** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
10. **Benziane, A. (2013).** The aquifer system of the Great Sebkhha of Oran: geological and hydrogeological considerations. *Bulletin de l'Institut Scientifique*, Rabat, Section Sciences de la Terre, (35), 77-92.
11. **Boetius, A., Anesio, A. M., Deming, J. W., Mikucki, J. A., & Rapp, J. Z. (2015).** Microbial ecology of the cryosphere: sea ice and glacial habitats. *Nature reviews. Microbiology*, 13(11), 677–690. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3522>.
12. **Bowers, K. J., Mesbah, N. M., & Wiegel, J. (2009).** Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life?. *Saline systems*, 5, 9. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-5-9>.
13. **Brock T. D. (1997).** The value of basic research: discovery of *Thermus aquaticus* and other extreme thermophiles. *Genetics*, 146(4), 1207–1210. <https://doi.org/10.1093/genetics/146.4.1207>.
14. **Brock, T. D. (1969).** "Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures." Springer-Verlag.
15. **Calimlioglu, B., & Arga, K. Y. (2014).** Proteins from halophilic bacteria: purification and their applications. *Protein Purification-Principles and Trends*, Edition 1, 145-168.
16. **CA-SFM. (2023).** Société Française de Microbiologie. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. In : CA-SFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie. Ed 2023.
17. **DasSarma, S. & DasSarma, P. (2012).** Halophiles. In eLS, (John Wiley & Sons, Ltd), New York. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000394.pub4>.
18. **DasSarma, S., & DasSarma, P. (2015).** Halophiles and their enzymes : negativity put to good use. *Current Opinion In Microbiology*, 25, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.009>.
19. **DasSarma, S., DasSarma, P., Laye, V. J., & Schwieterman, E. W. (2020).** Extremophilic models for astrobiology: haloarchaeal survival strategies and pigments for remote sensing. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 24 (1), 31–41. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01126-3>.



20. de la Haba, R. R., Sánchez-Porro, C., Marquez, M. C., & Ventosa, A. (2011). Taxonomy of Halophiles. In: Horikoshi K. (eds) *Extremophiles Handbook*. Springer, Tokyo. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1_13).
21. de Lourdes Moreno, M., Pérez, D., García, M. T., & Mellado, E. (2013). Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life (Basel, Switzerland)*, 3 (1), 38–51. <https://doi.org/10.3390/life3010038>.
22. De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., & Whitman, W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes*. 2nd ed (Vol. 3). USA : Springer.
23. Di Donato, P., Buono, A., Poli, A., Finore, I., Abbamondi, R. G., Nicolaus, B., & Lama, L. (2018). Exploring marine environments for the identification of extremophiles and their enzymes for sustainable and green bioprocesses. *Sustainability* 11:149. <https://doi.org/10.3390/su11010149>.
24. Didari, M., Bagheri, M., Amoozegar, M. A., Bouzari, S., Babavalian, H., Tebyanian, H., Hassanshahian, M., & Ventosa, A. (2020). Diversity of halophilic and halotolerant bacteria in the largest seasonal hypersaline lake (Aran-Bidgol-Iran). *Journal of environmental health science & engineering*, 18(2), 961–971. <https://doi.org/10.1007/s40201-020-00519-3>.
25. Dutta, B., & Bandopadhyay, R. (2022). Biotechnological potentials of halophilic microorganisms and their impact on mankind. *Beni-Suef University journal of basic and applied sciences*, 11(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00252-w>.
26. Edbeib, M. F., Wahab, R. A., & Huyop, F. (2016). Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World journal of microbiology & biotechnology*, 32(8), 135. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2081-9>.
27. Fongaro, G., Maia, G. A., Rogovski, P., Cadamuro, R. D., Lopes, J. C., Moreira, R. S., Camargo, A. F., Scapini, T., Stefanski, F. S., Bonatto, C., Marques Souza, D. S., Stoco, P. H., Duarte, R. T. D., Cabral da Cruz, A. C., Wagner, G., & Treichel, H. (2020). Extremophile Microbial Communities and Enzymes for Bioenergetic Application Based on Multi-Omics Tools. *Current genomics*, 21(4), 240–252. <https://doi.org/10.2174/1389202921999200601144137>.
28. Gibtan, A., Park, K., Woo, M., Shin, J. K., Lee, D. W., Sohn, J. H., Song, M., Roh, S. W., Lee, S. J., & Lee, H. S. (2017). Diversity of extremely halophilic archaeal and

## Références bibliographiques

- bacterial communities from commercial salts. *Frontiers in microbiology*, 8, 799. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00799>.
29. Gomes, J., & Steiner, W. (2004). The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes: Review. *Food Technology and Biotechnology*, 42 (4), 223-235.
30. Gomri, M.A., Bentaleb, A., Boucekrit, S., & Kharroub, K. (2021). Isolation of thermophilic bacteria producing exopolysaccharides from the geothermal spring of Hammam Grouz (Mila, Algeria). *Algerian Journal of Nutrition and Food Sciences*, 1(4), 1–9. <https://fac.umc.edu.dz/inataa/revue/files/ajnfs0104001>.
31. Gopinath, S. C., Anbu, P., Arshad, M. K., Lakshmipriya, T., Voon, C. H., Hashim, U., & Chinni, S. V. (2017). Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *BioMed research international*, 2017, 1272193. <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>.
32. Granner, D.K., Murray, R.K., & Rodwell, V.W. (2008). Biochimie de Harper. 3<sup>ème</sup> édition. De Boeck. Bruxelles., 47. pp. 49-51, 483.
33. Guevara-Luna, J., Arroyo-Herrera, I., Tapia-García, E. Y., Estrada-de Los Santos, P., Ortega-Nava, A. J., & Vásquez-Murrieta, M. S. (2024). Diversity and biotechnological potential of cultivable halophilic and halotolerant bacteria from the "Los Negritos" geothermal area. *Microorganisms*, 12 (3), 482. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030482>.
34. Guiraud, J. P. (1998). Techniques d'analyses microbiologiques. In: microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris, 576p : 168–333.
35. Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., & Oren, A. (2018). Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS microbiology reviews*, 42(3), 353–375. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>.
36. Guo, J., Wu, Q., Wang, R., Zhang, X., Wang, X., & Chen, W. (2020). A novel  $\alpha$ -galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* with broad pH stability and significant reduction of raffinose family oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(24), 6574-6582. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02180>.
37. Gupta, G. N., Srivastava, S., Khare, S. K., & Prakash, V. (2014). Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 7(2), 371-380. <https://doi.org/10.5958/2230-732X.2014.00258.7>.

38. Gupta, V., Sharma, S., & Singh, A. (2022). Extremozymes from halophilic microorganisms: diversity, characteristics and industrial applications. *Frontiers in Microbiology*, 13, 825437. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.825437>.
39. Han, N., Wang, X., Wang, H., & Tang, X. (2020). Enzymatic properties and gene cloning of a novel maltase from *Thermus thermophilus* HB27. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 174, 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2020.112657>.
40. Harley, J.P., & Prescott, L. M. (2002). *Laboratory Exercises in Microbiology*, Fifth ed. New York: The McGraw-Hill Companies. 449p.
41. Health Protection Agency. (2011). Catalase Test. UK Standards for Microbiology Investigations. 8 Issue 2.2.
42. Hmidet, N., El-Hadj Ali, N., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S.-K., & Nasri, M. (2009). Alkaline proteases and thermostable  $\alpha$ -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal*, 47 (1-3) : 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.005>.
43. Hughes-Pask, R. A., & Williams, R. A. D., (1977). Yellow-pigmented Strains of *Thermus ssp.* from Icelandic Hot Springs. *Journal of General Microbiology*, 102 (1), 375- 383.
44. Irwin, J. A., & Baird, A. W. (2004). Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Irish veterinary journal*, 57(6), 348–354. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-57-6-348>.
45. Jayachandra, S. Y., Anil Kumar, S., Merley, D. P., & Sulochana, M. B. (2012). Isolation and characterization of extreme halophilic bacterium *Salinicoccus sp.* JAS4 producing extracellular hydrolytic enzymes. *Recent Research in Science and Technology*. 4(4), 46-49.
46. Jin, Z., & Sun, E. (2022). Recent advances in  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: Natural sources and therapeutic potential. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 22(3), 295-312. <https://doi.org/10.2174/1389557521666210720112615>.
47. Kharroub, K., Gomri, M. A., Aguilera, M., & Monteoliva Sanchez, M. (2014). Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaea isolated from Algerian sabkhas. *African Journal of Microbiology Research*, 8(52). <https://doi.org/10.5897/AJMR2014.7183>.
48. Klouche Khelil, N., Aissaoui, N., Nas, F., Cayol, J. L., & Ghellai L. (2013). A novel halotolerant bacterium isolated from El Goléa Lake in Algeria and antimicrobia potential of this strain. *Journal of Agricultural Science and Technology A*. 3: 825-834

49. Kochhar, N., I K, K., Shrivastava, S., Ghosh, A., Rawat, V. S., Sodhi, K. K., & Kumar, M. (2022). Perspectives on the microorganism of extreme environments and their applications. *Current research in microbial sciences*, 3, 100134. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100134>.
50. Kumar, S., Karan, R., Kapoor, S., S P, S., & S K, K. (2012). Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Brazilian journal of microbiology*. 43(4), 1595–1603. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120004000044>.
51. Lewinson, O., Padan, E., & Bibi, E. (2004). Alkalitolerance: a biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (39), 14073-14078.
52. Li, J., Yun, Y. Q., Xing, L., & Song, L. (2017). Novel bioflocculant produced by salt-tolerant, alkaliphilic strain *Oceanobacillus polygوني* HG6 and its application in tannery wastewater treatment. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 81(5), 1018–1025. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1274635>.
53. Li, X., & Yu, H. Y. (2012). Characterization of an organic solvent-tolerant  $\alpha$ -amylase from a halophilic isolate, *Thalassobacillus* sp. LY18. *Folia microbiologica*, 57 (5), 447–453. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0160-3>.
54. Logan, N. A., Berge, O., Bishop, A. H., Busse, H. J., De Vos, P., Fritze, D., Heyndrickx, M., Kämpfer, P., Rabinovitch, L., Salkinoja-Salonen, M. S., Seldin, L., & Ventosa, A. (2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 59 (8), 2114-2121. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.013649-0>.
55. Menasria, T., Aguilera, M., Hocine, H., Benammar, L., Ayachi, A., Si Bachir, A., Dekak, A., & Monteoliva-Sánchez, M. (2018). Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. *Microbiological Research*, 207. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.011>.
56. Menasria, T., Monteoliva-Sánchez, M., Benammar, L., Benhadj, M., Ayachi, A., Hacène, H., Gonzalez-Paredes, A., & Aguilera, M. (2019). Culturable halophilic bacteria inhabiting Algerian saline ecosystems: A source of promising features and potentialities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(9). <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2705-y>.

57. Merino, N., Aronson, H. S., Bojanova, D. P., Feyhl-Buska, J., Wong, M. L., Zhang, S., & Giovannelli, D. (2019). Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Frontiers in microbiology*, 10, 780. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00780>.
58. Naghoni, A., Emtiazi, G., Amoozegar, M. A., Cretoiu, M. S., Stal, L. J., Etemadifar, Z., Shahzadeh Fazeli, S. A., & Bolhuis, H. (2017). Microbial diversity in the hypersaline Lake Meyghan, Iran. *Scientific reports*, 7(1), 11522. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11585-3>.
59. Nas, F., Aissaoui, N., Mahjoubi, M., Mosbah, A., Arab, M., Abdelwahed, S., Khrouf, R., Masmoudi, A. S., Cherif, A., & Klouche-Khelil, N. (2021). A comparative GC-MS analysis of bioactive secondary metabolites produced by halotolerant *Bacillus* spp. isolated from the Great Sebkhah of Oran. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 24(3), 455–470. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00185-x>.
60. Oren A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 28(1), 56–63. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000176>.
61. Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations : phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems*, 4, 2. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-2>.
62. Oren, A. (2012). Two centuries of microbiological research in the Wadi Natrun, Egypt: a model system for the study of the ecology, physiology, and taxonomy of haloalkaliphilic microorganisms. In Seckbach J, Oren A, Stan-Lotter H (ed), *Poly extremophiles organisms living under multiple stress*, in press. Springer, Dordrecht, the Netherlands.
63. Pastor, J. M., Bernal, V., Salvador, M., Argandoña, M., Vargas, C., Csonka, L., Sevilla, A., Iborra, J. L., Nieto, J. J., & Cánovas, M. (2013). Role of central metabolism in the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *The Journal of biological chemistry*, 288 (24), 17769–17781. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.470567>.
64. Public Health England. (2014). Oxidase Test. UK Standards for Microbiology Investigations. 26 Issue 2.3.
65. Purohit M. S., Tipre, D. R., Shah, M. B. & Dave, S. R. (2016). Isolation of halotolerant and halophilic bacteria and screening of their poly enzyme potential. *Indian Journal of Geo-Marine Science*. 45(1) : 129-136.

66. Quadri, I., Hassani, I. I., l' Haridon, S., Chalopin, M., Hacène, H., & Jebbar, M. (2016). Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environments of the Algerian Sahara. *Microbiological Research*, 186-187, 119–131. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.003>.
67. Rahman, S. S., Siddique, R., & Tabassum, N. (2017). Isolation and identification of halotolerant soil bacteria from coastal Patenga area. *BMC research notes*, 10 (1), 531. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2855-7>.
68. Richards, L. A. (1954). Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. US Salinity Lab., US Department of Agriculture Handbook 60 California, USA.
69. Ruginescu, R., Enache, M., Popescu, O., Gomoiu, I., Cojoc, R., Batrinescu-Moteau, C., Maria, G., Dumbravician, M., & Neagu, S. (2022). Characterization of Some Salt-Tolerant Bacterial Hydrolases with Potential Utility in Cultural Heritage Bio-Cleaning. *Microorganisms*, 10 (3), 644. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030644>.
70. Ruginescu, R., Gomoiu, I., Popescu, O., Cojoc, R., Neagu, S., Lucaci, I., Batrinescu, M., C., & Enache, M. (2020). Bioprospecting for novel halophilic and halotolerant sources of hydrolytic enzymes in brackish, saline and hypersaline lakes of romania. *Microorganisms*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121903>.
71. Saibi, A. N. E., Nas, F., Arab, M., Aissaoui, N., Boukeroui, Y., & Klouche-Khelil, N. (2022). Antimicrobial and Enzymatic Profiling of Halophilic and Halotolerant Bacteria from a Hypersaline Lake The Great Sebkhha of Oran, Northwestern Algeria, *Geomicrobiology Journal*, 39 (9), 816–831. <https://doi.org/10.1080/01490451.2022.2079777>.
72. Sánchez-Porro, C., Mellado, E., Bertoldo, C., Antranikian, G., & Ventosa, A. (2003). Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 7(3), 221–228. <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0316-9>.
73. Sangeetha, R., Arulpandi, I., & Geetha, A. (2011). Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: An overview. *Research journal of microbiology*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.3923/jm.2011.1.24>.
74. Schultz, J., & Rosado, A. S. (2020). Extreme environments: a source of biosurfactants for biotechnological applications. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 24(2), 189–206. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01151-2>.

75. Sharma, A., Kawarabayasi, Y., & Satyanarayana, T. (2012). Acidophilic bacteria and archaea: acid stable biocatalysts and their potential applications. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 16 (1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s00792-011-0402-3>.
76. Shivanand, P., & Mugeraya, G. (2011). Halophilic bacteria and their compatible solutes– osmoregulation and potential applications. *Current Science*, 100 (10), 1516-1521.
77. Sigurgísladóttir, S., Konráðsdóttir, M., Jónsson, Á., Kristjánsson, J. K., & Matthiasson, E. (1993). Lipase activity of thermophilic bacteria from Icelandic hot springs. *Biotechnology Letters*, 15(4), 361-366.
78. Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>.
79. Soil Survey Staff (2010). Keys to Soil Taxonomy, 11th ed. USDA-Natural Resources Conservation Service, Washington, DC.
80. Sysoev, M., Grötzinger, S. W., Renn, D., Eppinger, J., Rueping, M., & Karan, R. (2021). Bioprospecting of Novel Extremozymes From Prokaryotes-The Advent of Culture-Independent Methods. *Frontiers in microbiology*, 12, 630013. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630013>.
81. Thaz, C. J., Lavanya, B., Kumar, J. P., & Jayaraman, G. (2015). Production and characterization of a halotolerant cellulase from *Bacillus aquimaris* VITP4 strain. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5, 412-424.
82. Vincent W. F., Mueller D. R. and Bonilla S. 2004. Ecosystems on ice: the microbial ecology of Markham Ice Shelf in the high Arctic. *Cryobiology* 48,103–112.
83. Williams, S. T., & Cross, T. (1971). Isolation, purification, cultivation and preservation of actinomycetes. *Methods Microbiol.* 4 : 295-334.
84. WRB. (2007). World Reference Base for Soil Resources, first update. World Soil Resources Reports N°103. FAO, Rome.
85. Yang, X., Wu, Y., Zhang, Y., Yang, E., Qu, Y., Xu, H., Chen, Y., Irbis, C., & Yan, J. (2020). A Thermo-Active Laccase Isoenzyme From *Trametes trogii* and Its Potential for Dye Decolorization at High Temperature. *Frontiers in microbiology*, 11, 241. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00241>.

## *Références bibliographiques*

- 86. Yin, J., Chen, J. C., Wu, Q., & Chen, G. Q. (2015).** Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology advances*, 33 (7), 1433–1442. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.008>.
- 87. Yousef, N. M. H., & Mawad, A. M. M. (2022).** Characterization of thermo/halo stable cellulase produced from halophilic *Virgibacillus salarius* BM-02 using non-pretreated biomass. *World journal of microbiology & biotechnology*, 39(1), 22. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03446-7>.



# **Annexes**

➤ **Annexe 01****Composition des milieux de culture et solutions****Bouillon Nutritif** (pH = 7,2 ± 0,2)

Peptone	20 g
Extrait de levure	05 g
Chlorure de sodium	05 g
Eau distillée	1000 mL

**Gélose Nutritive** (pH = 6,8 à 7,4)

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

**Gélose Müller- Hinton** (pH = 7,4)

Infusion de viande de bœuf	300 g
Hydrolysate de caséine	17,5 g
Amidon	01,5 g
Agar	17 g
Eau distillée	1000 mL

**Milieu Mannitol-Mobilité** (pH = 8,1± 0,2)

Peptone	20 g
Nitrate de potassium	01 g
Mannitol	02 g
Rouge de phénol	40 mg
Agar	04 g
Eau distillée	1000 mL

**Gélose viande-foie** (pH = 7,6)

Extrait de viande	10 g
Peptone	20 g
Extrait de levure	10 g
Glucose	05 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL

**Gélose à amidon**

Gélose nutritive	100 mL
Amidon	1g

**Gélose à gélatine**

Gélose Nutritive supplémentée de NaCl	100 mL
Cellulose	1 g

**Gélose au lait**

Lait écrémé poudre	10 g
Gélose Nutritive supplémentée de NaCl	100 mL

**N. B.** Au moment de l'utilisation, mettre la gélose nutritive en surfusion (45°C) et ajouter du lait stérile. Après agitation, le mélange est coulé sur boîte pétri.

**Gélose à la cellulose**

Gélose Nutritive supplémentée de NaCl	100 mL
Cellulose	1 g

**Gélose au tween 80**

Gélose Nutritive supplémentée de NaCl	100 mL
Tween 80	1 mL

**Gélose à l'huile d'olive**

Gélose Nutritive supplémentée de NaCl	100 mL
l'huile d'olive	2.5 mL

**Gélose au jaune d'œuf**

Gélose Nutritive supplémentée de NaCl	100 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 dans un bécher stérile et additionner aseptiquement 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.

## ➤ Annexe 02

## Catalogue analytique de la galerie ID 32 E

TABLEAU DE LECTURE						
UPULE	TEST	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTAT	
					NEGATIF	POSITIF
1.0	ODC	L-ornithine	0.76	Ornithine DeCarboxylase	jaune / jaune-orange	rouge / orange
1.1	ADH	L-arginine	0.76	Arginine DiHydrolase		
1.2	LDC	L-lysine	0.76	Lysine DeCarboxylase	jaune-vert	bleu-violet
1.3	URE	urée	0.44	UREase	jaune / jaune-orange	rose-violet
1.4	LARL	L-arabitol	0.56	L-ARabitoL (Acidification)		
1.5	GAT	acide galacturonique	0.56	GA lacturonaTe (Acidification)	bleu / bleu-vert	jaune / vert-jaune
1.6	5KG	potassium 5-oxetogluconate	0.82	5 KetoGluconate (Acidification)		
1.7	LIP	5-bromo-3-indoxyl-nonanoate	0.035	LIPase	incoloré	bleu
1.8	RP	sodium pyruvate	1.21	Rouge de Phénol (Acidification)	rouge / orange	jaune
1.9	βGLU	4-nitrophényl-βD-glucopyranoside	0.03	βGLUcosidase	incoloré	jaune
1.A	MAN	D-mannitol	0.56	MANnitol (Acidification)		
1.B	MAL	D-maltose	0.56	MALtose (Acidification)		
1.C	ADO	adenitol	0.56	ADONitol (Acidification)	bleu / bleu-vert	jaune / vert-jaune
1.D	PLE	palatinose	0.56	PaLatiNose (Acidification)		
1.E	βGUR	4-nitrophényl-βD-glucuronide	0.03	βGLUCURonidase	incoloré	jaune
1.F	MNT	sodium malonate	0.184	MalONaTe	jaune / vert pâle	bleu-vert / bleu
0.0	IND	L-tryptophane	0.077	INDole (Production)	JAMES / immédiat (*) incoloré / jaune / beige / rose / rouge	
0.1	βNAG	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl-βD-glucosaminide	0.045	N-Acetyl-β-Glucosaminidase	incoloré	bleu
0.2	βGAL	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0.03	βGALactosidase	incoloré	jaune
0.3	GLU	D-glucose	0.56	GLUCose (Acidification)		
0.4	SAC	D-saccharose	0.56	SACcharose (Acidification)		
0.5	LARA	L-arabinose	0.56	L-ARAbinose (Acidification)	bleu / bleu-vert	jaune / vert-jaune
0.6	DARL	D-arabitol	0.56	D-ARAbitoL (Acidification)		
0.7	αGLU	4-nitrophényl-αD-glucopyranoside	0.03	αGLUCosidase	incoloré	jaune
0.8	αGAL	4-nitrophényl-αD-galactopyranoside	0.09	αGALactosidase		
0.9	TRE	D-trehalose	0.56	TREhalose (Acidification)		
0.A	RHA	L-rhamnose	0.56	RHAMnose (Acidification)		
0.B	INO	inositol	0.56	INOSitol (Acidification)	bleu / bleu-vert	jaune / vert-jaune
0.C	CEL	D-cellobiose	0.56	CELlobiose (Acidification)		
0.D	SOR	D-sorbitol	0.56	SORbitol (Acidification)		
0.E	αMAL	4-nitrophényl-αD-maltopyranoside	0.092	αMALtositase	incoloré / jaune très pâle	jaune
0.F	AspA	acide L-aspartique 4-nitroamide	0.058	acide L-Aspartique Arylamidase	incoloré / jaune très pâle	jaune

## ملخص

توفر الإنزيمات التي تنتجها الكائنات الحية الدقيقة المحبة أو المقاومة للملح، إمكانيات عديدة لتطبيقات مبتكرة في مختلف المجالات. نظراً لأهميتها في مجال التكنولوجيا الحيوية والحاجة الحالية لمنتجات أكثر كفاءة لمثل هذه المحفزات، تهدف هذه الدراسة إلى فحص الإنزيمات المحللة: الأميلاز، البروتياز، السيلولاز، الإستيراز والليباز من عشر عزلات معزولة من السبخة الكبرى بوهران. تم تقييم إنتاج الإنزيم على وسط الأجار بتركيز 15% من NaCl. من بين العزلات العشرة، أظهرت 9 عزلات نشاطاً تحليلياً ملحوظاً ضد ما لا يقل عن 4 مكونات مع تفوق نشاط الإنزيم المحلل للبروتين والسيلولوز. تم اختيار عزلتين، LMB3S04 و LMB3S25، لنطاقهما الواسع من النشاط التحليلي ومستويات LEA العالية لدراسة أنشطتهما الأنزيمية على الوسط مغذي سائل. كشفت هذه الدراسة عن نشاط كبير للإنزيم المحلل للبروتين لدى العزلة LMB3S25. أظهرت اختبارات الثبات الحراري عند 55 درجة مئوية و70 درجة مئوية و100 درجة مئوية لمدة 10 دقائق، تحفيزاً حرارياً لنشاط إنزيم البروتياز عند 55 درجة مئوية، وانخفاضاً للنشاط عند 70 درجة مئوية واختفاء كامل للنشاط عند 100 درجة مئوية.

كما تم إخضاع العزلات المختارة للتوصيف الظاهري. ظهرت على شكل عصيات موجبة الجرام، متحركة، تمتلك إنزيمات الكاتلاز والأكسيداز. كشف نظام ID 32 عن إمكانيات إيجابية مثيرة للاهتمام ونشاط إنزيمي واعد. أتاحت دراسة تحمل كلوريد الصوديوم تصنيف العزلة LMB3S04 من بين البكتيريا المحتملة للملح بشكل معتدل والعزلة LMB3S25 من بين البكتيريا المحبة للملح بشدة. أظهر النمو عند درجات حرارة ومستويات pH مختلفة صفات التحمل الحراري والقلوي للعزلات. أظهر مخطط المضادات الحيوية مظاهر مقاومة متنوعة، وأبدت العزلات مقاومة للفانكوميسين والفسوفوميسين، وحساسية للكاناميسين. فيما يتعلق بالأموكسيسيلين، وجد أن العزلة LMB3S25 حساسة والعزلة LMB3S04 مقاومة. فيما يتعلق بالتوبراميسين، أظهرت العزلة LMB3S25 مقاومة، على عكس العزلة LMB3S04 التي أظهرت حساسية.

قد تشكل هذه العزلات وإنزيماتها مصادر واعدة لمختلف تطبيقات التكنولوجيا الحيوية.

**الكلمات المفتاحية:** البيئات المالحة، البكتيريا المحبة والمقاومة للملحة، الإنزيمات، التطبيقات البيوتكنولوجية.

## Résumé

Les enzymes produites par les microorganismes halophiles et halotolérants offrent de nombreuses possibilités d'applications innovantes dans des domaines variés. Compte tenu de leur importance biotechnologique et du besoin actuel de producteurs plus efficaces de tels catalyseurs, la présente étude visait à cribler des enzymes hydrolytiques : amylases, protéases, estérases et lipases de dix souches isolées de la Grande sebkha d'Oran. La production des enzymes a été évaluée sur milieu gélosé à une concentration de 15% de NaCl. Sur les dix isolats, 9 isolats ont montré des activités hydrolytiques significatives contre au moins de 4 substrats avec une dominance des activités protéasique et cellulolytique.

Deux isolats, le LMB3S04 et LMB3S25, ont été sélectionnés pour leur large spectre d'activité hydrolytique et leurs niveaux LEA élevés pour la mise en évidence de leurs activités enzymatiques extracellulaires sur milieu liquide. Cette étude a révélé une activité protéasique importante pour l'isolat LMB3S25. L'étude de sa stabilité thermique réalisée à 55°C, 70°C et 100°C pendant 10 minutes a montré une thermoactivation à 55°C, une diminution de l'activité à 70°C et une désactivation complète à 100°C.

Les isolats sélectionnés ont également été soumis à une caractérisation phénotypique. Ils se présentent sous forme de bâtonnets à Gram positif, mobiles, et possédant une catalase et oxydase. Le système ID 32 a révélé un potentiel métabolique intéressant et un bagage enzymatique prometteur. L'étude de la tolérance au NaCl a permis de classer l'isolat LMB3S04 parmi les bactéries modérément halotolérantes et l'isolat LMB3S25 parmi les bactéries halophiles extrêmes. La croissance à différentes températures et pH a mis en évidence les caractères thermotolérants et alcalitolerants des isolats. L'antibiogramme a révélé des profils de résistances variés, les isolats ont montré une résistance à la Vancomycine et la Fosfomycine, et une sensibilité à la Kanamycine. Concernant l'amoxicilline, l'isolat LMB3S25 s'est avéré sensible, tandis que l'isolat LMB3S04 a montré une résistance. En ce qui concerne la Tobramycine, l'isolat LMB3S25 a montré une résistance, contrairement à l'isolat LMB3S04 qui y est sensible.

Ces isolats ainsi que leurs enzymes peuvent constituer des candidats prometteurs pour diverses applications biotechnologiques.

**Mots clés :** écosystèmes salins, bactéries halophiles et halotolérantes, enzymes, applications biotechnologiques

## Abstract

Salt-tolerant enzymes produced by halophilic and halotolerant microorganisms offer numerous opportunities for innovative applications in various fields. Given their biotechnological significance and the current need for more efficient producers of such catalysts, the present study aimed to screen for hydrolytic enzymes, including amylases, proteases, esterases, and lipases, from ten strains isolated from the Great Sebkha of Oran. Enzyme production was evaluated on agar medium containing 15% NaCl. Out of the ten isolates, nine exhibited significant hydrolytic activities against at least four substrates, with a predominance of proteolytic and cellulolytic activities.

Two isolates, LMB3S04 and LMB3S25, were selected for their broad spectrum of hydrolytic activities and high levels of extracellular enzyme activity (LEA) for further investigation of their enzymatic activities in liquid medium. This study revealed significant protease activity for isolate LMB3S25. Thermal stability testing at 55°C, 70°C, and 100°C for 10 minutes showed thermoactivation at 55°C, a decrease in activity at 70°C, and complete deactivation at 100°C.

The selected isolates were also subjected to phenotypic characterization. They appeared as Gram-positive, rod-shaped, motile bacteria possessing catalase and oxidase. The ID 32 system revealed an interesting metabolic potential and a promising enzymatic profile. The study of NaCl tolerance classified isolate LMB3S04 as moderately halotolerant and isolate LMB3S25 as extremely halophilic. Growth at different temperatures and pH levels highlighted the thermotolerant and alkalitolerant nature of the isolates. Antibiotic susceptibility testing revealed varied resistance profiles: the isolates were resistant to vancomycin and fosfomycin, and sensitive to kanamycin. Regarding amoxicillin, isolate LMB3S25 was sensitive, while isolate LMB3S04 showed resistance. For tobramycin, isolate LMB3S25 exhibited resistance, whereas isolate LMB3S04 was sensitive.

These isolates and their enzymes may serve as promising candidates for various biotechnological applications.

**Keywords :** saline ecosystems, halophilic and halotolerant bacteria, enzymes, biotechnological applications