



**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

**M<sup>lle</sup> KHALDI Imane**

**M<sup>me</sup> TAIBI Souad**

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie et Contrôle de Qualité

## **Thème**

**Evaluation du potentiel antimicrobien de bactéries  
extrêmophiles isolées de la grande sebkha d'Oran.**

Soutenu le **23 /06/ 2024**

Devant le jury composé de :

<b>Présidente</b>	KLOUCHE KHELIL Nihel Amina	Professeur à l'Université de Tlemcen-Algérie
<b>Promotrice</b>	NAS Fatima ep. RABEHI	M.A.B. Université de Tlemcen-Algérie
<b>Examinatrice</b>	BELLIFA Samia ep. BENAMMAR	M.C.A. Université de Tlemcen-Algérie

# Remerciements

Tout d'abord, on rend grâce à **Allah**, le tout puissant, qui nous nous a donné la force, le courage, la santé et la patience pour accomplir ce travail.

Nos vifs remerciements s'adressent aux membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail

- Professeur **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, Votre participation revêt une importance capitale et nous vous en sommes profondément reconnaissantes.
- Dr. **BELLIFA SAMIA** Maitre de Conférences A à l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen d'avoir accepté d'examiner notre travail. Nous sommes particulièrement honorée de bénéficier de vos remarques et nous tenons à vous assurer de notre profonde gratitude.

Nous tenons tout particulièrement à remercier Mme **NAS Fatima**, Maitre-assistant B. à l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, de nous avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail sous sa direction. Merci pour le temps qu'elle nous a accordé, sa patience infinie, ses précieux conseils et son soutien tout au long de la réalisation de notre mémoire. Sa gentillesse, sa bienveillance et ses qualités humaines remarquables ont été pour nous une source d'inspiration et de motivation.

Un grand merci s'adresse également à tous nos enseignants au département de **Biologie - faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers**. Leurs enseignements et leurs conseils ont été précieux tout au long de notre cursus universitaire.

Nos remerciements s'adresse également à tous les membres du Laboratoire de **Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE)**.

Enfin, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail. Leur soutien et leur encouragement ont été essentiels à notre réussite.

# *Dédicaces*

*A mes parents, pour leur amour inconditionnel, leur soutien indéfectible et leurs encouragements constants tout au long de mon parcours académique, leur foie en moi a été ma source de motivation.*

*A mes frères et mes sœur pour leur soutien constant et leur encouragements, que dieu les protège.*

*A mes amies pour leur soutien moral et leur compréhension durant les moments de stress.*

*Je souhaite exprimer ma reconnaissance à mes professeurs, pour leur expertise, leur patience et leurs conseils avise qui ont enrichi mon apprentissage.*

*Je remercie toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.*

***A tous ceux qui me sont chers***

*Imane*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail :*

*A ma mère **FATIHA** aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti, pour mon instruction et mon bien être. Ses efforts pour que j'atteigne ce niveau Que dieu vous procure santé, prospérité et bonheur...*

*A la mémoire de mon père **BOUFALDJA** qui aurait bien voulu voir cet instant, il a été toujours pour moi d'un grand réconfort. Que leur âme repose en paix (amen).*

*A mon cher époux **RACHID** qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles.*

*C'est un moment de plaisir de dédier cet œuvre, à mes princes : **Younes, Moustapha Fouzi, Mouhamed Rassim**, je souhaite une vie pleine de bonheur, de joie et de réussite, que votre chemin soit plein succès.*

*A mon cher frère **MOURAD** et sa petite famille que dieu vous garde pour moi.*

*Toute personne qui de près ou de loin a participé à notre formation, à toutes les équipes du **LAMAABE** en particulier l'équipe 3 et à toutes les personnes qui nous ont aidé à réaliser ce travail.*

*Souad*

# Table des matières

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>I. Les microorganismes halophiles et halotolérants : définition et classification.....</b>	<b>3</b>
<b>II. Les habitats des microorganismes halophiles et halotolérants.....</b>	<b>3</b>
II. 1. Les sols salins.....	4
II. 2. Les milieux salins aquatiques.....	4
<b>III. L’halophilisme / l’halotolérance et les mécanismes d’adaptation.....</b>	<b>5</b>
III. 1. L’adaptation par accumulation de KCl(Salt-in strategy ou High salt-in).....	5
III.2.L’adaptation par productions ou accumulation de solutés organiques (les osmoprotecteurs) « Compatible-solute strategy » ou « Low salt-in ».....	6
<b>IV. Diversité phylogénétiques des procaryotes halophiles et halotolérants.....</b>	<b>7</b>
<b>V. Métabolites antimicrobiens des microorganismes halophiles et halotolérants....</b>	<b>9</b>
<b>VI. Autres applications biotechnologiques des microorganismes halophiles et halotolérants.....</b>	<b>10</b>
VI. 1. Production des extrêmoenzymes.....	10
VI. 2. Production de solutés compatibles.....	11
VI. 3. Production de pigments caroténoïdes et antioxydants.....	11
VI. 4. Production d’Exopolysaccharides EPS.....	12
VI. 5. Bactériorhodopsines.....	12
VI. 6. Production de biosurfactants.....	12
<b>Matériel et méthodes</b>	
<b>I. Origine des isolats.....</b>	<b>14</b>
I. 1. Revivification et vérification de la pureté des isolats.....	14
I. 2. Présentation de la Grande Sebkh d’Oran.....	14
<b>II. Criblage des activités antimicrobiennes des isolats.....</b>	<b>15</b>
II. 1. Recherche de la production des métabolites antimicrobiens sur milieu gélosé.....	16

II. 2. Recherche de la production des métabolites antimicrobiens sur milieu liquide.....	16
II. 3 Extraction des métabolites antimicrobiens de l'isolat le plus prometteur à partir du milieu gélosé .....	17
II. 4. Évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits bruts.....	17
<b>III. Caractérisation phénotypique de l'isolat le plus prometteur.....</b>	<b>18</b>
III. 1. Détermination des caractères microscopiques et macroscopiques.....	18
III. 2. Croissance à différentes conditions de température, pH et salinité.....	18
III. 3. Détermination des caractères biochimiques.....	19
III. 3. 1. Les systèmes API 20E et API ID32.....	19
III. 3. 2. Mise en évidence de la catalase.....	19
III. 3. 3. Mise en évidence de l'oxydase.....	19
III. 3. 4. Le test Mannitol-Mobilité.....	20
III. 3. 5. Recherche du type respiratoire.....	20
III. 3. 6. Étude du profil de sensibilité aux antibiotiques.....	20
<b>Résultats et Discussions</b>	
<b>I. Criblage des activités antimicrobiennes des isolats.....</b>	<b>21</b>
I. 1. Résultat.....	21
I. 1. 1. Recherche de la production des métabolites antimicrobiens sur milieu gélosé....	21
I. 1. 2. Recherche de la production des activités antimicrobiennes sur milieu liquide (Submerged fermentation SmF).....	23
I. 1. 3. Extraction des métabolites antimicrobiens de l'isolat à partir du milieu solide....	25
I. 2. Discussion.....	25
<b>II. Caractérisation phénotypique de l'isolat LMB3S01.....</b>	<b>29</b>
II. 1. Résultats.....	29
II. 1. 1. Caractères microscopiques et macroscopiques.....	29
II. 1. 2. Caractérisation physiologique.....	30
II. 1. 3. Caractérisation biochimique.....	30
II. 1. 4. Étude de la sensibilité de l'isolat aux antibiotiques.....	33
II. 2. Discussion.....	33
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>35</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>37</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>47</b>

## ملخص

مع عودة ظهور مقاومة المضادات الحيوية، يظل البحث عن مركبات جديدة أو بديلة مضادة للميكروبات أولوية. تمثل النظم البيئية المتطرفة، بما في ذلك الأوساط المالحة، مصدرًا واعدًا لعزل الكائنات الحية الدقيقة القادرة على إنتاج مركبات طبيعية عالية الإمكانيات يمكنها معالجة تحديات مقاومة مضادات الميكروبات الحالية.

الهدف من عملنا هو فحص الأنشطة المضادة للميكروبات من البكتيريا المتطرفة المعزولة في سبخة وهران. لهذا، تم إجراء فحص أولي لأنشطتهم المضادة للميكروبات. وبدأ إنتاج هذه الأنشطة في الوسط المتوسط والسائل. تم البحث عن الأنشطة المثبطة من خلال تقنية أسطوانات الأغار للمزارع على وسط أغار وتقنية الأبار للجراثيم الفانقة فيما يتعلق بالجراثيم المرجعية (البكتيريا الإيجابية والغرام السلبية والخمائر). أظهر الفحص الأولي أن الإنتاج على الوسط الصلب هو الأكثر فعالية و ابرز أن العزلة LMB3S01 هي الأكثر نشاطًا. تم استخراج أنشطتها المضادة للميكروبات من زراعتها على الوسط الصلب. تم استخدام ثلاثة مذيبات من مختلف الاستقطابات: الكلوروفورم وأسيتات الإيثيل والميثانول. أظهرت المستخلصات الثلاثة التي تم الحصول عليها تأثيرًا مثبتًا ضد الجراثيم التي تم اختبارها سابقًا ولكن بتأثير أضعف من الذي تم الحصول عليه عن طريق الفحص الأولي. تم اختيار LMB3S01 المعزولة أيضًا للتوصيف الظاهري، وهي عصيات ايجابية الجرام ، هوائية ، تمتلك الكاتالاز والأوكسيداز. كشف تقييم نموها في ظروف مختلفة من الملوحة ودرجة الحرارة والأس الهيدروجيني أنها معزولة شديدة التحمل للملوحة الحرارة والأوساط القلوية. كشف توصيفها الكيميائي الحيوي من خلال أنظمة ID32 AP 20<sup>E</sup> عن قوة أفضية مثيرة للاهتمام. كشفت دراسة لمقاومتها المضادات الحيوية عن حساسيتها تجاه Tobramycin و Kanamycin و مقاومتها Amoxicillin و Vancomycin و Fosfomycin

**الكلمات الرئيسية :** بكتيريا البيئات القاسية ، والأنشطة المضادة للميكروبات، والأوساط المالحة.

## Résumé

Avec la réémergence de résistance aux antibiotiques, La recherche de composés antimicrobiens nouveaux ou alternatifs demeure une priorité. Les écosystèmes extrêmes, notamment les habitats salins, représentent une source prometteuse pour l'isolement de microorganismes capables de produire des composés naturels à fort potentiel qui peuvent faire face aux défis actuels de résistance aux antimicrobiens.

L'objectif de notre travail est de réaliser un criblage des activités antimicrobiennes à partir des bactéries extrémophiles isolées de la grande sebkha d'Oran. Pour cela, un screening primaire de leurs activités antimicrobiennes a été effectué. La production des activités a été lancée sur milieu gélosé et sur milieu liquide. La recherche des activités inhibitrices a été effectuée par la technique des cylindres d'agar pour les cultures sur milieu gélosé et la technique des puits pour les surnagants vis-à-vis des germes de références (Bactéries à Gram positif et à Gram négatif, et des levures). Le screening primaire a montré que la production sur milieu solide est la plus rentable et a fait ressortir l'isolat LMB3S01 comme l'isolat le plus prometteur, ses activités antimicrobiennes ont été extraites à partir de sa culture sur milieu solide. Trois solvants de différentes polarités ont été utilisés : chloroforme, acétate d'éthyle et méthanol. Les trois extraits obtenus ont démontré un effet inhibiteurs vis-à-vis les germes précédemment testés mais avec des diamètres moins importants que ceux obtenus par le screening primaire. L'isolat LMB3S01 a été également retenu pour faire l'objet d'une caractérisation phénotypique, c'est un bâtonnet à Gram positif mobile, aérobic stricte, possédant la catalase et l'oxydase. L'évaluation de sa croissance à différentes conditions de salinité, de température et de pH a révélé qu'il s'agit d'un isolat halotolérant extrême, thermotolérant et alcalotolérant. Sa caractérisation biochimique par les systèmes API 20E et ID32 a fait apparaitre un pouvoir métabolique intéressant. L'étude de son profil de résistance aux antibiotiques a révélé une sensibilité à la Kanamycine et Tobramycine et une résistance à la Fosfomycine, Vancomycine et Amoxicilline

**Mots clés :** microorganismes extrémophiles, activités antimicrobienne, habitats salins.



## **Abstract**

With the re-emergence of antibiotic resistance, the search for new or alternative antimicrobial compound remains a priority. Extreme ecosystems, including saline habitats, represent a promising source for the isolation of microorganisms able to produce high-potential natural compounds that can address current antimicrobial resistance challenges.

The objective of our work is to screen antimicrobial activities from the isolated extremophile bacteria of the great sebkha of Oran. For this, a primary screening of their antimicrobial activities was carried out. The production of the activities was searched on agar medium and liquid medium. The search for inhibitory activities was carried out by the technique of plug agar for cultures on agar medium and the technique of wells for supernatants against reference germs (Gram positive and Gram negative bacteria, and yeasts). Primary screening showed that solid medium production is the most effective and highlighted isolate LMB3S01 as the most promising isolate; its antimicrobial activities were extracted from its solid medium culture. Three solvents of different polarities were used: chloroform, ethyl acetate and methanol. The three obtained extract demonstrated an inhibitory effect against the tested germs but with smaller diameters than those obtained by primary screening. Isolate LMB3S01 was also selected for phenotypic characterization; it is an aerobic, motile, Gram positive rod-shaped bacterium, possessing catalase and oxidase. The evaluation of its growth at different salinity, temperature and pH conditions revealed that it is an extreme halotolerant, thermotolerant and alkalotolerant isolate. Its biochemical characterization by the API 20E and ID32 systems revealed an interesting metabolic power. The study of its antibiotic resistance profile revealed sensitivity to Kanamycin and Tobramycin and resistance to Fosfomycin, Vancomycin and Amoxicillin

**Keywords:** extremophilic microorganisms, antimicrobial activities, saline habitats.

## Liste des Abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**API 20E** : Appareil et procédés d'identification

**ARN** : Acide ribonucléique

**ATCC** : American type culture collection

**CLSI** : Clinical and Laboratory Standards Institute

**DO** : Densité optique

**EPS** : Exopolysaccharides

**IP444** : Institut pasteur

**Km** : Kilomètre

**P/v** : Poids/volume

**PGP** : Plant Growth promoting

**PH** : Potential d'hydrogen

**V/V** : Volume/volume

**μ S** : Microséismes

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b>	Schéma représentatif de différents systèmes de transport d'ions à travers la membrane plasmique des archées halophiles aérobies de la famille des <i>Halobacteriaceae</i> .	<b>06</b>
<b>Figure 2 :</b>	Situation géographique de la Grande Sebkhha d'Oran.	<b>15</b>
<b>Figure 3 :</b>	Photos des résultats de l'activité antimicrobienne des 10 isolats par la technique des cylindres d'agar vis-à-vis <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Micrococcus luteus</i> (B).	<b>21</b>
<b>Figure 4 :</b>	Fréquence des isolats producteurs d'activités antimicrobiennes vis-à-vis chaque germe test.	<b>23</b>
<b>Figure 5 :</b>	Fréquence des surnageants actives vis-à-vis les germes tests.	<b>24</b>
<b>Figure 6 :</b>	l'aspect des cellules (A) et des colonies (B) de l'isolat LMB3S01 après 24 heures d'incubation à 30°C sur Gélose Nutritive à 15% de NaCl.	<b>29</b>
<b>Figure 7 :</b>	Résultats de la caractérisation biochimique (A, B, C, D, E, F) de l'isolat LMB3S01	<b>32</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b>	Germes de référence utilisés	<b>15</b>
<b>Tableau 2 :</b>	Diamètres des zones d'inhibition en millimètre (mm) obtenus par la technique des cylindres d'agar.	<b>22</b>
<b>Tableau 3 :</b>	Diamètres des zones d'inhibition en millimètre (mm) obtenus à partir du screening primaire des activités antimicrobiennes des isolats sur milieu liquide.	<b>24</b>
<b>Tableau 4 :</b>	Diamètres des zones d'inhibition des différents extraits par la technique des disques en papier.	<b>25</b>
<b>Tableau 5 :</b>	intervalles de salinité, de température et de pH permettant la croissance des isolats.	<b>30</b>
<b>Tableau 6 :</b>	Caractères biochimiques de l'isolat LMB3S02	<b>31</b>
<b>Tableau 7 :</b>	Résultats de l'antibiogramme de l'isolat LMB3S01	<b>33</b>

# **Introduction**

### **Introduction**

La découverte de communautés microbiennes dans des habitats considérés comme hostiles et extrêmes tels que les régions volcaniques, les océans polaires, les lacs salés, les sources hydrothermales, a révélé que les paramètres physico-chimiques permettant le développement de la vie sont beaucoup plus larges qu'on ne le croyait. Les organismes prospérant dans de tels écosystèmes hostiles sont qualifiés extrêmophiles et ne se contentent pas de résister aux conditions extrêmes, mais ils y trouvent un environnement propice à leur croissance (**Abbamondi et al., 2019**).

En fonction des conditions extrêmes auxquels les microorganismes extrêmophiles sont confrontés, ils peuvent être classés en plusieurs groupes : les halophiles ou halotolérants, qui peuvent survivre dans des conditions de forte salinité ; les thermophiles, qui prospèrent à des températures élevées ; les psychrophiles, adaptés aux températures froides ; les alcalophiles, qui vivent dans des environnements alcalins ; les acidophiles, qui préfèrent les environnements acides et les piézophiles, qui tolèrent des pressions élevées (**Kochhar et al., 2022**).

Les capacités étonnantes d'adaptation des microorganismes extrêmophiles aux conditions extrêmes ont conduit à s'interroger sur les stratégies et les mécanismes cellulaires, moléculaires et génétiques mis en jeu par ces microorganismes pour se maintenir dans de tels milieux. La compréhension de ces stratégies ouvre des perspectives immenses et prometteuses pour l'exploitation de ces microorganismes en biotechnologie. Leur étude approfondie pourrait conduire à la découverte de nouvelles substances exceptionnelles, avec des applications potentielles dans de nombreux domaines, allant de la santé humaine à la protection de l'environnement. Egalement, l'exploitation de ces microorganismes exceptionnels pourrait révolutionner de nombreuses industries et offrir des solutions inauguratrices aux défis actuels.

Les microorganismes halophiles et halotolérants présentent un groupe intéressant au sein des microorganismes extrêmophiles. Ils possèdent des caractéristiques biotechnologiques et industrielles spécifiques, à savoir la capacité de produire des biopolymères, des pigments, des antimicrobiens, des biosurfactants, des solutés compatibles et des enzymes hydrolytiques. En outre, ces microorganismes deviennent de plus en plus utiles comme moyen alternatif, sûr et efficace de bioremédiation d'environnements salins contaminés (**Yadav et al., 2018**).

## *Introduction*

Compte tenu de l'importance de ce groupe de microorganismes, l'objectif principal de notre mémoire s'est porté sur l'évaluation du potentiel biotechnologique de production d'activités antimicrobiennes par un ensemble d'isolats bactériens extrêmophiles provenant d'une collection isolée par Dr. NAS Fatima le 21 septembre 2019 à partir de la Grande Sebka d'Oran.

Pour atteindre cet objectif, un protocole expérimental précis a été suivi. Dans un premier temps, un screening primaire des activités antibactériennes et antifongiques contre des germes de référence a été réalisé en utilisant la technique des cylindres d'agar. La deuxième étape a consisté en l'extraction des métabolites secondaires bioactifs de l'isolat le plus performant à l'aide de solvants de polarités variées, suivie de l'évaluation de leur activité. Enfin, la dernière étape a été dédiée à la caractérisation phénotypique de l'isolat le plus bioactif.

**Synthèse**

**bibliographique**



## **I. Les microorganismes halophiles et halotolérants : définition et classification**

Les microorganismes halophiles et halotolérants constituent un groupe de microorganismes extrémophiles qui prospèrent dans des habitats caractérisés par des concentrations extrêmes de sels (**Dutta et al., 2022**).

Ces microorganismes sont divisés en deux communautés : les halophiles et les halotolérants.

Les microorganismes halophiles dépendent strictement de 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 la croissance, trois catégories sont définies (**Abaramak et al., 2020**) :

- **Les microorganismes légèrement halophiles** qui se développent sur un intervalle de salinité de 0,34 à 0,85 M.
- **Les halophiles modérés** qui se développent à des concentrations comprises entre 0,85 et 3,4 M de NaCl.
- **Les halophiles extrêmes** qui se développent sur un intervalle de salinité allant de 3,4 à 5,1 M.

En revanche, les microorganismes halotolérants sont capables de se développer en absence de sel et de tolérer des concentrations salines croissantes. En se basant sur leur halotolérance, trois catégories sont déterminées (**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.

## **II. Les habitats des microorganismes halophiles et halotolérants**

Les microorganismes halophiles et halotolérants prospèrent dans des habitats salins et hypersalins où les concentrations de sels, principalement du NaCl, sont très élevées. Ces environnements constituent une grande partie de la biosphère terrestre dont les systèmes aquatiques et terrestres naturels constituent les principaux (**Kiplimo et al., 2019**).

Outre la salinité, ces environnements réunis d'autres facteurs tels que l'alcalinité, les faibles taux d'oxygène, la pression, la température, les rayons solaires, les métaux lourds et d'autres substances toxiques (pesticides, produits chimiques) (**La Cono et al., 2019 ; Vera-Gargallo et al., 2019**).

Les microorganismes halophiles et halotolérants prolifèrent également dans d'autres habitats anthropiques tels que les saumures, les champs de pétrole, les étangs, les tanneries et les aliments salés (**Akpolat et al., 2015**).

### **II. 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 établi une valeur de référence de 15000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (**WRB, 2007**). En 2010, le système de classification du Soil Survey Staff a fixé ce seuil à 30000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (**Soil Survey Staff, 2010**).

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

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

Ces eaux sont divisées en deux catégories selon leur origine : les eaux thalassohalines et les eaux athalassohalines (**Akpolat et al., 2021 ; Fisher 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 (exemple : Le grand lac salé).
- **Les eaux athalassohalines** : elles sont proviennent de la dissolution par l'eau des évaporites (dépôts de sels) formés par l'évaporation complète de l'eau de mer. 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 et Wadi An Naturn en Egypt.

### **III. L'halophilisme / l'halotolérance et les mécanismes d'adaptation**

Dans les milieux salins et hypersalins, les micro-organismes halophiles et halotolérants sont confrontés à une forte concentration de sel et une activité d'eau extrêmement faible et donc une forte osmolarité.

Afin de maintenir l'équilibre osmotique à travers leurs membranes cellulaires et éviter la perte d'eau cytoplasmique, 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**).

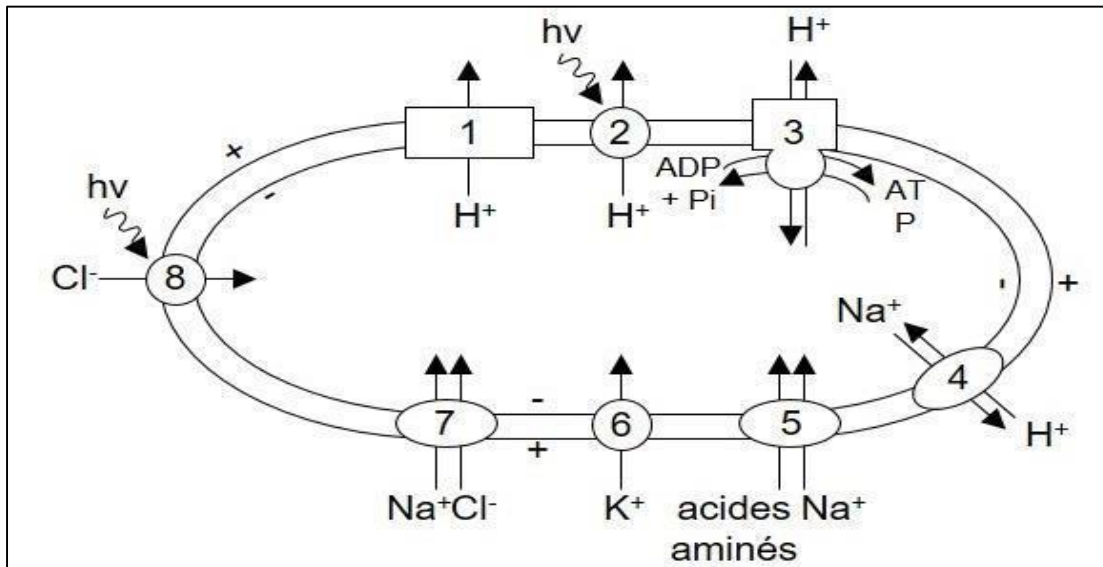
#### **III. 1. L'adaptation par accumulation de KCl (Salt-in strategy ou High salt-in)**

Le but de cette stratégie d'adaptation est d'empêcher la sortie d'eau par accumulation intracellulaire du KCl dans le cytoplasme. Ce mécanisme est largement adopté chez les *Archaea* halophiles extrêmes et certaines bactéries halophiles extrêmes. La concentration de KCl intracellulaire chez ces microorganismes est plus importante que la concentration extracellulaire du NaCl, ce qui conduit à la restauration de la pression de turgescence en assurant l'équilibre osmotique des deux côtés de la membrane plasmique (**Hänelt et Müller, 2013**).

La régulation de la concentration en ions est possible grâce à l'action coopérative de plusieurs protéines de transport, pompes ioniques, transporteurs couplés ou autres, qui permettent les échanges bidirectionnels des molécules et d'ions (**Oren, 2006**). Ces différents échanges sont illustrés dans **la figure 1**.

Chez les halophiles, la force motrice utilisée pour le transport d'ions est une différence de potentiel formé de part et d'autre de la membrane grâce à :

- la chaîne respiratoire, au niveau de laquelle le transport d'électrons est accompagné par l'extrusion des protons,
- des protéines membranaires, 'les bactériorhodopsines ou halorhodopsine', qui grâce à leur pigment rétinol, sous l'effet de la lumière peuvent aussi être utilisées pour la génération d'un gradient de protons, ou encore
- l'utilisation des ATP synthases fonctionnant contre le gradient protons H<sup>+</sup> où elle entraîne la formation d'ATP.



**Figure 1:** Schéma représentatif de différents systèmes de transport d'ions à travers la membrane plasmique des archées halophiles aérobies de la famille des *Halobacteriaceae* (Oren, 2006).

1. Extrusion de protons via transport d'électrons respiratoire ;2. Extrusion de protons induite par la lumière de la bactériorhodopsine ;3. Formation d'ATP par l'ATP synthase, entraînée par le gradient de proton ;4. Antiport sodium / proton ; 5. Transport interne des acides aminés induit par le gradient de sodium ;6. Potassium uniport, entraîné par le potentiel membranaire ;7. Système de transport de chlorure indépendant de la lumière, associé au transport de sodium vers l'intérieur ;8. Pompe de chlorure entraînée par la lumière, à médiation par l'halorhodopsine.

L'accumulation de fortes quantités de KCl soumet les microorganismes à un nouveau stress cellulaire, elle favorise les liaisons hydrophobes inter- et intra protéiques conduisant à l'agrégation et à la destruction des structures protéiques et réduit la disponibilité de l'eau dans la cellule à cause de l'hydratation des sels. Or, les microorganismes halophiles et halotolérants ne semblent pas connaître ce stress, leurs protéines ne sont pas seulement fonctionnelles et stables à de telles salinités mais elles se dénaturent dès que la concentration en KCl diminue en dessous de 1M. Elles sont en ce sens qualifiées de protéines halophiles (Edbeib *et al.*, 2016).

### III. 2. L'adaptation par productions ou accumulation de solutés organiques (les osmoprotecteurs) « Compatible-solute strategy » ou « Low salt-in »

Cette stratégie est basée sur l'exclusion du sodium et l'accumulation de composés organiques de faible poids moléculaire solubles dans l'eau afin éviter la perte d'eau. Ces composés peuvent être soit synthétisés par la cellule ou importés de l'environnement

externe par des systèmes de transport sans qu'ils interfèrent avec leurs métabolismes. Ils sont appelés « solutés compatibles », ils comprennent des polyols et leurs dérivés, les sucres et dérivés, les acides aminés et dérivés, les bêtaïnes, l'ectoïnes (**Shivanand et Mugeraya, 2011**).

Ce mécanisme est largement utilisé dans les trois domaines de vie *Archaea*, *Eucarya* et *Bacteria*. Les microorganismes utilisant ce mécanisme sont plus flexibles pour l'adaptation à la pression osmotique que les microorganismes utilisant le mécanisme de l'accumulation de KCl. Également, l'adaptation à la salinité par l'accumulation de solutés organiques nécessite moins d'adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire que la stratégie de l'accumulation des ions potassium, cependant la production des solutés est énergétiquement coûteuse (**Oren, 2002**).

#### **IV. Diversité phylogénétiques des procaryotes halophiles et halotolérants**

Les halophiles et les halotolérants se trouvent dans les trois domaines du vivant : les Archées, les Bactéries et les Eucaryotes. Les procaryotes halophiles et halotolérants sont présentés les archées et les bactéries.

Les halophiles les plus extrêmes appartiennent au domaine des *Archeae*, ils sont principaux responsables de la coloration rose à rouge des saumures et des couches de sel. Des analyses métagénomiques d'échantillons provenant des milieux salins extrêmes tels que la mer Morte, la mer Rouge, le golfe de Cambay, la mer Méditerranée, la forêt de mangroves des Sundarbans et de la mine de sel de Karak, ont révélé la prédominance des genres haloarchéens : *Haloarcula*, *Halorubrum*, *Haloferax*, *Natrialba* et *Halorhabdus* (**Moopantakath et al., 2023**).

Les types des écosystèmes influent fortement sur la biogéographie des haloarchées. Par exemple, le genre *Haloferax* est fortement dominant sur les bords de mer, les îles et les estuaires, tandis que le genre *Natrialba* prédomine dans les rivières, les mangroves et les lacs (**Hegazy et al., 2020; Moopantakath et al., 2020; Cho et al., 2021**).

Les bactéries halophiles et halotolérantes se répartissent surtout dans des environnements avec des salinités allant jusqu'à 10 à 15 %. Parmi les phyla les plus dominant : *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes* (**Gibtan et al., 2017**).

Néanmoins, il existe des espèces bactériennes halophiles extrêmes comme exemple l'espèce *Salinibacter ruber* du phylum des *Bacteroidetes*. Cette bactérie requiert une concentration en sels très élevée avec une croissance optimale enregistrée à une concentration de 20 à 30 % de sel (p/v) (**Oren et al., 2013 ; Didari et al., 2020**). Il y a également quelques espèces du phylum *Deinococcus-Thermus* qui est reconnu comme l'un des phyla bactériens les plus extrémophiles. Il contient deux ordres *Deinococcales* (avec les genres : *Deinococcus*,

*Deinobacterium* et *Truepera*) et Thermales (avec les genres : *Thermus*, *Meiothermus*, *Marinithermus*, *Oceanithermus* et *Vulcanithermus*), les membres de ce phylum ont été détectés, dans des habitats où la salinité dépasse 340 g.L<sup>-1</sup> (Abdallah *et al.*, 2016).

Les bactéries du phylum *Firmicutes* sont hautement diversifiés au niveau morphologique et physiologique et sont capables d'habiter une grande variété d'environnements. Les *Clostridia* et *Bacilli* constituent les classes les plus dominantes avec un nombre important d'espèces halophiles isolées de différents 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 comportant plus d'espèces sont : *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 cyanobactéries peuvent être trouvées sur une très large gamme de concentrations de sel, de l'eau douce aux habitats hypersalins et aux tapis microbiens à des salinités de 250 g.L<sup>-1</sup> et plus les espèces les plus répandues sont la cyanobactérie unicellulaire *Aphanothece halophytica* et les espèces filamenteuses *Microcoleus chthonoplastes* et *Halospirulina tapeticola* (Oren, 2012).

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

Dans le phylum de *Proteobacteria*, la classe la plus abondante dans les milieux hypersalins est celle des *Gammaproteobacteria*, elle renferme de nombreux ordres tels que *Alteromonadales*, *Vibrionales*, *Pseudomonadales*, *Oceanospirillales*, *Enterobacteriales*, et *Legionellales*. La classe des *Deltaproteobacteria* regroupe des espèces halophiles modérées anaérobies strictes sulfatoréductrices, chimio-organotrophes, chimiolitho-hétérotrophes ou chimiolitho-autotrophes (de la Haba *et al.*, 2011 ; Naghoni *et al.*, 2017).

## V. Métabolites antimicrobiens des microorganismes halophiles et halotolérants

Les microorganismes halophiles et halotolérants produisent une variété de composés antimicrobiens qui peuvent être des peptides ou d'autres métabolites secondaires. A titre d'exemples nous citons : les dicétopipérazines, les phénazines, les lipopeptides, polyketides, les macrolactines, les terpènes, les acides gras et leurs dérivés et les halocines (**Tommonaro et al., 2012 ; Charlesworth et Burns, 2015 ; Auckloo et Wu, 2016 ; Kumar et al., 2016 ; Nas et al., 2022**).

Les dicétopipérazine sont des composés organiques cycliques issus des liaisons peptidiques entre deux acides aminés (**Lalitha et al., 2016**). Ils sont stables et résistent à la protéolyse. Ils constituent une pléthore de bioactivités potentiellement importantes pour des utilités industrielles et médicales, notamment des activités antibactériennes, antifongiques, antiparasitaires, insecticides et antivirales (**Harizani et al., 2020**). Ils ont été identifiées chez des espèces de bactéries et d'actinomycètes halophiles apparentant aux genres (*Bacillus Halobacillus, Actinopolyspora, Nocardiosis, Salinispota*) et archées halophiles (*Haloterrigena, Natronococcus*) (**Tommonaro et al., 2012; Hamedi et al., 2013 ; Nas et al., 2022**).

Les acides gras et leurs dérivés sont très connus pour leurs puissantes propriétés antibactériennes et antifongiques. En raison de leur faible toxicité et de leur haute biodégradabilité, ils ne sont pas nocifs pour l'environnement. De plus, ces composés possèdent une grande stabilité face aux températures extrêmes, aux variations de pH et à la salinité. Ils sont également autorisés en tant qu'additifs alimentaires. Les champignons pathogènes montrent une moindre probabilité de développer une résistance aux acides gras antifongiques (**Gad et al., 2016**).

De même, les archées halophiles sont également utilisées dans diverses industries, notamment l'industrie du textile qui utilise des quantités importantes de sels pour le tannage en raison de leur pouvoir de produire des halocines qui sont des substances antimicrobiennes de nature protéique. Ces molécules ont été décrites pour la première fois par **Rodriguez-valera et al., (1982)**, elles inhibent les *haloarchaeae* phylogénétiquement liées. Certaines halocines ont en plus un potentiel médical tel que l'halocine H6 produite par *Haloferax gibbonsii* qui a été indiqué comme traitement pour réduire les ischémies lors d'une transplantation d'organe chez les chiens (**Charlesworth et Burns, 2015**).

## **VI. Autres applications biotechnologiques des microorganismes halophiles et halotolérants**

Grâce au métabolisme original et à leur capacité à évoluer dans les environnements extrêmes hypersalins, Les microorganismes halophiles et halotolérants produisent des métabolites uniques autres que les antimicrobiens qui peuvent être exploités pour des fins biotechnologiques comme : les enzymes hydrolytiques, les solutés compatibles, les antioxydants, les pigments, les exopolysaccharides, les biosurfactants et autres (**Dutta et Bandopadhyay, 2022**). Ces microorganismes pourraient être également utilisés comme des stimulateurs de la croissance végétale (Plant Growth Promoting Bacteria) (**Reang et al., 2022**) et dans les procédés de bioremédiation de l'environnement (**Jeong et Choi, 2020**).

### **VI. 1. Production des extrêmoenzymes**

Les microorganismes halophiles et halotolérants présentent une excellente source d'extrêmoenzymes qui ne sont pas uniquement stables et actives à des concentrations élevées de sel, mais, elles sont également tolérantes à des températures froides et élevées, stables à des pH alcalins et en présence de solvants organiques, ce qui les rend très utiles dans divers applications industrielles (**Gupta et al., 2022**).

- Dans l'industrie alimentaire, les extrêmoenzymes, comme les amylases et les protéases, sont utilisées dans la production de produits alimentaires et de boissons, y compris la fermentation, la production de sirops de glucose, et l'amélioration de la texture et de la saveur des produits alimentaires.
- Dans l'industrie Pharmaceutique, ces enzymes sont utilisées dans la synthèse de produits pharmaceutiques, la production de biocatalyseurs spécifiques, et le développement de nouvelles thérapies enzymatiques.
- Pour le traitement des déchets, les extrêmoenzymes telles que les lipases et les cellulases sont employées dans le traitement des déchets industriels, y compris la dégradation des huiles et des graisses, et la conversion des déchets ligno-cellulosiques en bioéthanol.
- En biotechnologie environnementale, les extrêmoenzymes sont utilisées pour la bioremédiation, y compris le traitement des sols et des eaux contaminées par des métaux lourds ou des polluants organiques.
- Dans l'industrie de textile, les cellulases et les pectinases produites par les microorganismes halophiles sont utilisées pour le traitement des tissus, y compris le délavage des jeans aussi bien que dans les détergents de blanchisserie utilisés pour attendrir les textiles, en remplaçant les procédés chimiques agressifs.



## **VI. 2. Production de solutés compatibles**

Les substances osmotiquement actives, également appelées solutés compatibles ou osmolytes, assurent l'équilibre de la pression osmotique et stabilisent les structures cellulaires des microorganismes halotolérants et halophiles dans les environnements hypersalins. Ils incluent les ectoines, les glycérols, les prolines, les bétaines, et les acides aminés (**Shivanand et Mugeraya, 2011**).

Ces solutés, de faible poids moléculaire, n'interfèrent pas avec les fonctions cellulaires même à des concentrations élevées, ce qui les rend particulièrement intéressants pour diverses applications biotechnologiques. Les ectoines et hydroxy-ectoines sont utilisés dans l'industrie cosmétique dans les produits de soins de la peau pour leurs propriétés hydratantes et protectrices contre les rayons UV et le stress environnemental. Les ectoines sont également explorées pour leur potentiel à stabiliser les protéines et les enzymes utilisées dans les formulations pharmaceutiques, augmentant ainsi leur efficacité et leur durée de conservation. Les solutés compatibles sont également utilisés pour stabiliser les protéines, les enzymes, et les vaccins pendant le stockage et le transport, assurant ainsi leur activité et leur efficacité. Ils peuvent être ajoutés aux formulations alimentaires pour améliorer la stabilité et la texture des produits, ainsi que pour protéger les cultures probiotiques dans les aliments fermentés. Dans l'industrie des détergents, ces solutés sont utilisés pour améliorer la stabilité et l'efficacité des enzymes, augmentant ainsi leur performance dans des conditions de lavage difficiles (**Shivanand et Mugeraya, 2011**).

## **VI. 3. Production de pigments caroténoïdes et antioxydants**

La coloration rouge et orangée développée dans les environnements hypersalins est due à la production de pigments caroténoïdes par les microorganismes halophiles tels que les genres *Dunaliella*, *Haloarchaea* (*Halobacterium salinarum*, *Halobaculum gomorrense*, *Haloferax mediterranei* et *Haloarcula marismortui*) et *Salinibacter ruber*. Les caroténoïdes les plus explorés sont le  $\beta$ -carotène,  $\alpha$ -bacterioruberin, xanthophylles, lycopen, l'astaxantine, la canthaxanthine et salinixanthine (**Saini et al., 2017**).

Ces composés offrent une vaste gamme d'applications biotechnologiques, couvrant les industries alimentaire, cosmétique, pharmaceutique et agricole. Dans l'industrie alimentaire, ils sont utilisés comme colorants naturels, leur origine naturelle et leur sécurité pour la consommation humaine les rendant particulièrement attrayants. Leurs propriétés antioxydantes permettent leur intégration dans des produits cosmétiques pour protéger la peau contre les dommages oxydatifs et les rayons UV, contribuant ainsi à l'amélioration de la santé de la peau

et à la prévention du vieillissement cutané. De plus, les caroténoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et antitumorales, ce qui les rend prometteurs pour le développement de médicaments (Serino *et al.*, 2023 ; Giani *et al.*, 2024).

### **VI. 4. Production d'Exopolysaccharides EPS**

Les microorganismes halophiles et halotolérants sont également sources importantes d'EPS, (Arundhati *et al.*, 2015). Ces molécules sont des polymères de sucres synthétisés par certains microorganismes via des mécanismes intracellulaires. Ils peuvent être excrétés dans le milieu environnant ou rester attachés à la cellule, formant des capsules (Llamas *et al.*, 2012).

Ils offrent une gamme étendue d'applications biotechnologiques, ils modifient les propriétés rhéologiques des systèmes aqueux, ils sont utilisés comme stabilisants, épaississants, gélifiants et émulsifiants dans les industries pharmaceutique, agroalimentaire, pétrolière, papetière, textile et cosmétique (Arundhati *et al.*, 2015). De plus, ils servent de dissolvants métalliques et bio-absorbants dans la récupération du pétrole et les mines (Biswas et Paul, 2014).

### **VI. 5. Bactériorhodopsines**

La bactériorhodopsine est une protéine transmembranaire trouvée dans la membrane cellulaire de certaines archées halophiles, telles que *Halobacterium salinarum*. Elle leur permet de utiliser la lumière pour créer des gradients de protons et de chlorure, qui sont essentiels à leurs processus bioénergétiques. Elle est utilisée dans de nombreuses applications techniques en raison de sa stabilité thermodynamique et photochimique telles que l'holographie, les réseaux neuronaux informatiques optiques et les dispositifs de mémoire optique. Elle peut être utilisée pour convertir l'ADP en ATP, offrant ainsi un moyen de recyclage énergétique alimenté par le soleil. Ceci pourrait être utile pour les processus biotechnologiques nécessitant beaucoup d'ATP (Margesin et Schinner, 2001 ; Oren, 2010).

### **VI. 6. Production de biosurfactants**

Les biosurfactants sont des agents tensioactifs synthétisés par des voies biologiques. Ces molécules peuvent être intracellulaires, extracellulaires ou localisées à la surface des cellules. Les microorganismes les produisent pour améliorer l'assimilation des composés insolubles dans l'eau, tels que les hydrocarbures, facilitant ainsi leur métabolisme. En effet, les biosurfactants facilitent l'attachement des cellules aux hydrocarbures en augmentant leur solubilité dans l'eau (émulsification) et leur diffusion à l'intérieur de la cellule microbienne (Al-Araji *et al.*, 2007).

Ces composés représentent une technologie prometteuse avec un potentiel considérable pour diverses applications, notamment dans l'agriculture, la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures, les polluants organiques et les métaux lourds, l'industrie pétrolière (particulièrement pour le nettoyage des bacs de stockage du pétrole), l'industrie alimentaire en tant qu'additifs et améliorants pour la boulangerie et la charcuterie, ainsi que dans les industries cosmétique et pharmaceutique où ils servent d'agents thérapeutiques aux propriétés antimicrobiennes, anticancéreuses et antioxydantes (**Huang *et al.*, 2010 ; Karnwal *et al.*, 2023**).

# **Matériel et Méthodes**

## **I. Origine des isolats**

Notre travail se concentre sur l'évaluation du potentiel biotechnologique de la production des activités antimicrobiennes par des isolats bactériens extrêmophiles issus de la grande sebkha d'Oran. Nous visons également à réaliser une identification phénotypique de l'isolat le plus performant et à extraire ces activités antimicrobiennes.

Les isolats font partie d'une collection de souches bactériennes isolées par Dr. NAS Fatima le 21 septembre 2019, et conservée à -20 °C dans du Bouillon Nutritif contenant 15 % de NaCl (p/v) et 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 isolats**

La revivification des isolats a été effectuée en les cultivant dans du Bouillon Nutritif à 15% de NaCl. Les cultures ont ensuite été incubées à 30 °C jusqu'à l'apparition d'un trouble.

La pureté des isolats a été vérifiée par des repiquages successifs sur Gélose Nutritive supplémentée de 15 % de NaCl (p/v) des cultures obtenues sur Bouillon Nutritif à 15% (p/v).

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

### **I. 2. Présentation de la Grande Sebkha d'Oran**

La Grande Sebkha d'Oran est un lac salé situé au nord de l'Algérie, au sud-ouest de la ville d'Oran, à une latitude de 35°42' Nord et une longitude de 00°48' Est, à 12 Km de la Mer Méditerranée (**Figure 2**). En 2002, elle a été classée comme zone humide d'importance internationale par la convention de Ramsar. L'eau de la sebkha est salée avec une conductivité électrique supérieure à 56 100  $\mu\text{S cm}^{-1}$  en hiver (**Nas et al., 2022**). Le sel forme une couche de 10 à 30 cm d'épaisseur qui dont la taille varie en fonction des précipitations et qui s'assèche complètement pendant la saison estivale. Les sols sont principalement d'origine alluviale, ont une texture argilo-sableuse (**Benziane, 2013**).

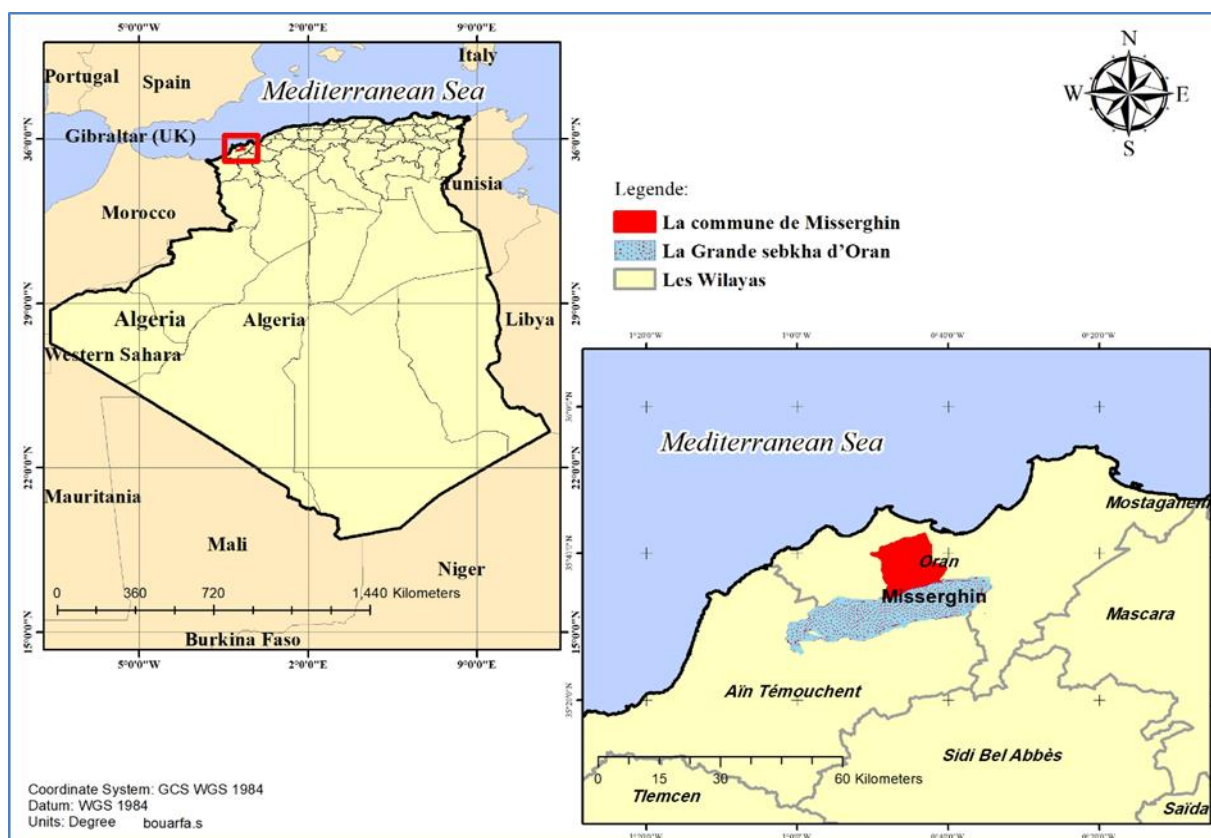


Figure 2: Situation géographique de la Grande Sebka d'Oran (Nas, 2022).

## II. Criblage des activités antimicrobiennes des isolats

La production des activités antimicrobiennes par les isolats a été étudiée à la fois sur milieu gélosé (Solid State Fermentation SSF) et sur milieu liquide (Submerged fermentation SmF) vis-à-vis 10 germes de référence (**Tableau 1**).

**Tableau 1** : les espèces utilisées

	Espèces	Référence
<b>Bactéries à Gram positif</b>	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 15307
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<b>Bactéries à Gram négatif</b>	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	ATCC 70603
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<b>Levures</b>	<i>Candida albicans</i>	IP444
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

## **II. 1. Recherche de la production des métabolites antimicrobiens sur milieu gélosé**

L'évaluation de la production des activités antimicrobiennes des isolats sur milieu gélose a été réalisé par la technique des cylindres d'agar (**Blouiri et al., 2016**). Cette méthode consiste à ensemencer les isolats en stries serrées sur la Gélose Nutritive à 15% de NaCl de façon à obtenir un tapis. Après 7 jours d'incubation à 30°C, des cylindres d'agar d'environ de 6 mm de diamètre sont prélevés et déposés sur des boîtes de pétri contenant des milieux gélosés Muller-Hinton (pour les bactéries) et Sabouraud (pour les levures) préalablement ensemencés par les suspensions des germes test en utilisant la technique d'écouvillonnage, selon les recommandations de la **CLSI (2015)**.

Des cylindres d'agar prélevés à partir de la Gélose Nutritive à 15 % de NaCl (p/v) non ensemencée ont été utilisés comme témoins.

Les boîtes de pétri sont placées pendant deux heures à 4°C pour permettre la diffusion des substances antimicrobiennes, puis incubées durant 24 heures à 37°C.

## **II. 2. Recherche de la production des métabolites antimicrobiens sur milieu liquide**

Pour cette étude, les isolats produisant des activités antimicrobiennes sur milieux gélosé ont été sélectionnés et cultivés sur milieu liquide pour tester l'activité de leurs 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 5 mL de Bouillon Nutritif à 15% de NaCl. Après 24 heures d'incubation à 30°C sous agitation (180 rpm), ces pré-cultures ont été introduites stérilement dans des tubes Falcon contenant 40 mL de Bouillon Nutritif additionné de 15% de NaCl.

Après sept (7) jours d'incubation à 30°C sous agitation (180 rpm), chaque culture a été centrifugée à 3000 t/min pendant 30 minutes et les surnageants ont été récupérés.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des surnageants a été effectuée par la technique des puits (**Balouiri et al., 2016**). Sur des géloses Muller-Hinton et Sabouraud préalablement ensemencées par la germes tests, 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. Des puits contrôles, ont reçues 50 µL de Bouillon Nutritif à 15 % de NaCl.

Les boîtes de pétri sont placées pendant deux heures à 4°C, puis incubées à 37°C. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés après 24 heures d'incubation.

### **II. 3 Extraction des métabolites antimicrobiens de l'isolat le plus prometteur à partir du milieu gélosé**

L'extraction des métabolites antimicrobiens de l'isolat sélectionné a été effectuée à partir de leurs cultures sur milieu gélosé en utilisant trois solvants de polarité différente ; le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le méthanol, selon le protocole de **Kim et al. (2016)** avec quelques modifications.

Des suspensions avec une  $DO_{600nm}$  de 0,1 dans du Bouillon Nutritif supplémenté de 15% de NaCl ont été utilisées pour ensemercer des Géloses Nutritives à 15% de NaCl. L'ensemencement a été effectué par écouvillonnage afin d'obtenir des cultures en tapis. Après 7 jours d'incubation à 30 °C, les cultures ont été soigneusement raclées, puis les géloses découpées et placées dans les différents solvants, à raison de deux boîtes pour 50 mL de chaque solvant.

Les mélanges gélose-solvant ont subi une agitation pendant deux heures à température ambiante, puis une filtration en utilisant le papier filtre. Les phases organiques ont été ensuite évaporées à 45 °C. Les résidus secs ont été récupérés dans 2 mL de DMSO.

### **II. 4. Évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits bruts**

Les différents extraits obtenus ont été testés pour leur pouvoir antimicrobien par la technique des disques en papier (**Balouiri et al., 2016**) vis-à-vis de *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 15307, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Escherichia coli* ATCC 25922, et *Candida albicans* ATCC 10231.

Des disques stériles de papier Whatman N° 3 de 6 mm de diamètre ont reçu 50 µL de chaque extrait et des disques témoins ont reçu 50 µL de DMSO purs par des dépôts successifs tout en évitant les débordements. Après séchage, les disques ont été déposés sur des boîtes de pétri contenant des milieux gélosés, Müller-Hinton et Sabouraud préalablement ensemencés par les suspensions des germes test.

Les boîtes de pétri ont été laissées pendant 2 heures à 4 °C, puis incubées durant 24 heures à 37 °C.



### **III. Caractérisation phénotypique de l'isolat le plus prometteur**

L'isolat présentant les activités antimicrobiennes les plus prometteuses a été choisi pour une caractérisation phénotypique, en suivant les tests proposés par **Logan *et al.* (2009)** pour la description de nouveaux isolats d'eubactéries halophiles et halotolérants.

#### **III. 1. Détermination des caractères microscopiques et macroscopiques**

Les caractéristiques microscopiques de notre isolat ont été examinées après 24 heures d'incubation à 30°C sur Gélose Nutritive à 15 % de NaCl.

- La mobilité a été évaluée par l'observation directe de cellules vivantes entre lame et lamelle, à l'aide d'un microscope photonique à objectif 40.
- La morphologie, le type de paroi et le mode de regroupement cellulaire ont été déterminés après une coloration de Gram, réalisée conformément au protocole établi par Gram en 1884, et les observations ont été faites avec un microscope photonique à objectif 100 à immersion.

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

#### **III. 2. Croissance à différentes conditions de température, pH et salinité**

Les intervalles de conditions physicochimiques (salinité, température et pH) favorisant la croissance de l'isolat sélectionné ont été établies en utilisant des milieux gélosés, en modifiant une de ces conditions tandis que les deux autres sont maintenues constantes (**Gomri *et al.*, 2021**). La croissance a été surveillée quotidiennement pendant 72 heures.

- La gamme de salinité favorable à la croissance a été établie en ensemençant l'isolat sur GN à pH 7 contenant des concentrations en NaCl allant de 0 à 30 % (p/v). Les cultures ont ensuite été incubées à 30°C.
- L'intervalle de température propice à la croissance a été déterminé en incubant l'isolat ensemenché sur GN à 15% de NaCl et un pH 7, à des températures variant entre 20 et 55°C.
- L'intervalle de pH favorable à la croissance a été déterminé par en cultivant l'isolat sur GN à 15% de NaCl, ajustée à des pH de 4, 5, 6, 7, 8 et 9. L'incubation a été effectuée à 30°C.

### **III. 3. Détermination des caractères biochimiques**

Sur le plan biochimique, la caractérisation de l'isolat a été effectuée à l'aide des systèmes API 20E (Logan et Berkeley, 1984) et API ID32, ainsi que par d'autres tests de la microbiologie classique.

#### **III. 3. 1. Les systèmes API 20E et API ID32**

Les galeries API forment un système simplifié et standardisé comprenant des microtubes contenant des substrats déshydratés, ce qui permet d'étudier les profils biochimiques des isolats.

La galerie API 20E permet de mettre en évidence 20 tests biochimiques, tandis que la API 32ID permet d'effectuée 32 tests (voir annexe 2).

Une suspension de notre isolat, avec une opacité de 0,5 McFarland ( $DO_{590\text{ nm}} = 0,1$ ), a été préparée dans de l'eau physiologique à partir d'une culture de 24 heures sur GN à 15 % de NaCl (p/v). Les galeries ont été inoculées conformément aux recommandations du fabricant (voir annexe). Après 24 heures d'incubation à 30°C, les réactions ont été observées, elles se traduisent par des changements de couleur spontanés ou après l'ajout de réactifs. Les résultats ont été interprétés en se référant au catalogue fourni avec la plaque (voir annexe 2).

#### **III. 3. 2. Mise en évidence de la catalase**

Il s'agit de la recherche de l'enzyme responsable de la décomposition du peroxyde d'hydrogène. Le principe consiste à mettre en contact une colonie de la souche avec une goutte de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). La présence de l'enzyme est indiquée par un dégagement immédiat de bulles gazeuses (Health Protection Agency, 2011).

#### **III. 3. 3. Mise en évidence de l'oxydase**

Le test d'oxydase vise à détecter la présence du cytochrome oxydase, la dernière enzyme de la chaîne respiratoire, qui transfère les électrons à l'oxygène ou à un autre oxydant minéral. Le principe consiste à déposer une colonie de la souche test sur un disque imprégné du réactif oxalate de N, N-diméthyl-1,4-phénylène diamine-dichlorure. La présence de l'enzyme est indiquée par le virage de la couleur rose du disque vers un violet noirâtre (Public Health England, 2014).

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

La mobilité de l'isolat ainsi que la fermentation du mannitol ont été déterminées sur le milieu semi solide de Mannitol-Mobilité. L'isolat a été ensemencé 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 autour de la piqûre d'inoculation (**Harley et Prescott, 2002**).

### **III. 3. 5. Recherche du type respiratoire**

La détermination du type respiratoire de l'isolat a été réalisée selon le protocole de **Guiraud (1998)** en utilisant une gélose profonde viande foie (VF) coulée dans des tubes. L'ensemencement a été effectué avec une pipette Pasteur, en introduisant l'inoculum au fond du tube à 45°C, puis en le remontant en spirale pour ensemencer uniformément le milieu. Après solidification du milieu, les cultures ont été incubées à 30°C pendant 72 heures. Les bactéries strictement aérobies se développent uniquement dans la zone superficielle, tandis que les bactéries aérobies-anaérobies facultatives se développent sur l'ensemble du tube.

### **III. 3. 6. Étude du profil de sensibilité aux antibiotiques**

Le profil de sensibilité aux antibiotiques de l'isolat a été déterminé, en utilisant la technique de diffusion des disques sur la gélose Müller-Hinton. 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).

À partir de cultures incubées pendant 24 heures à 30 °C sur GN avec 15 % de NaCl (p/v), une suspension de turbidité équivalente à 0,5 McFarland a été préparée dans un bouillon nutritif contenant également 15 % de NaCl. Cette suspension a ensuite été ensemencée par écouvillonnage sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose Müller-Hinton. 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 zones d'inhibition ont été mesurées et la classification des bactéries comme intermédiaires, résistantes ou sensibles aux antibiotiques a été réalisée selon les interprétations de **CA-SFM (2023)**.

# Résultats et Discussion

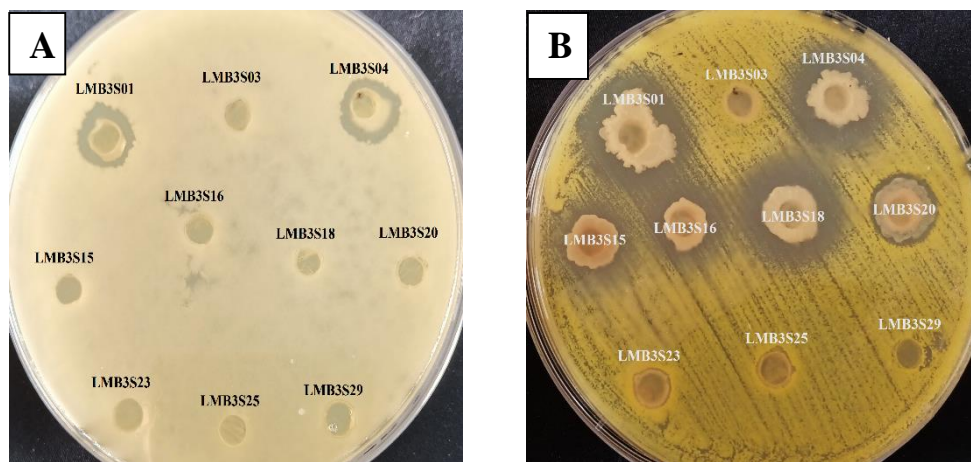
## I. Criblage des activités antimicrobiennes des isolats

### I. 1. Résultat

#### I. 1. 1. Recherche de la production des métabolites antimicrobiens sur milieu gélosé

Après la revivification et la purification des 10 isolats, leur capacité à produire des activités antimicrobiennes vis-à-vis des germes de référence a été évaluée en utilisant la technique des cylindres d'agar, après sept jours de leur culture à 30°C sur Gélose Nutritive à 15% de NaCl (p/v).

Les photos dans la **figure 3** montrent les résultats de l'activité antimicrobienne de quelques isolats vis-à-vis *Bacillus cereus* et *Micrococcus luteus*.



**Figure 3:** Photos des résultats des activités antimicrobiennes des 10 isolats par la technique des cylindres d'agar vis-à-vis *Bacillus cereus* (A); *Micrococcus luteus*. (B)

L'expérience a été effectuée en duplicata. Les différentes moyennes des diamètres des zones d'inhibition sont présentées dans le **tableau 2**. Il en ressort que, sur les 10 isolats testés, 6 isolats possèdent des activités inhibitrices de la croissance des germes tests. Cette activité varie d'un isolat à l'autre : 3 isolats (LMB3S01, LMB3S04 et LMB3S18) montrent des activités antibactériennes à la fois vis-à-vis les bactéries à Gram (+) et à Gram (-). Trois autres isolats (LMB3S15, LMB3S16 et LMB3S20) exercent un effet inhibiteur contre un seul germe test, le *Micrococcus luteus*. Aucune activité antifongique n'a été enregistrée.

**Tableau 2:** Diamètres des zones d'inhibition en millimètre (mm) obtenus par la technique des cylindres d'agar.

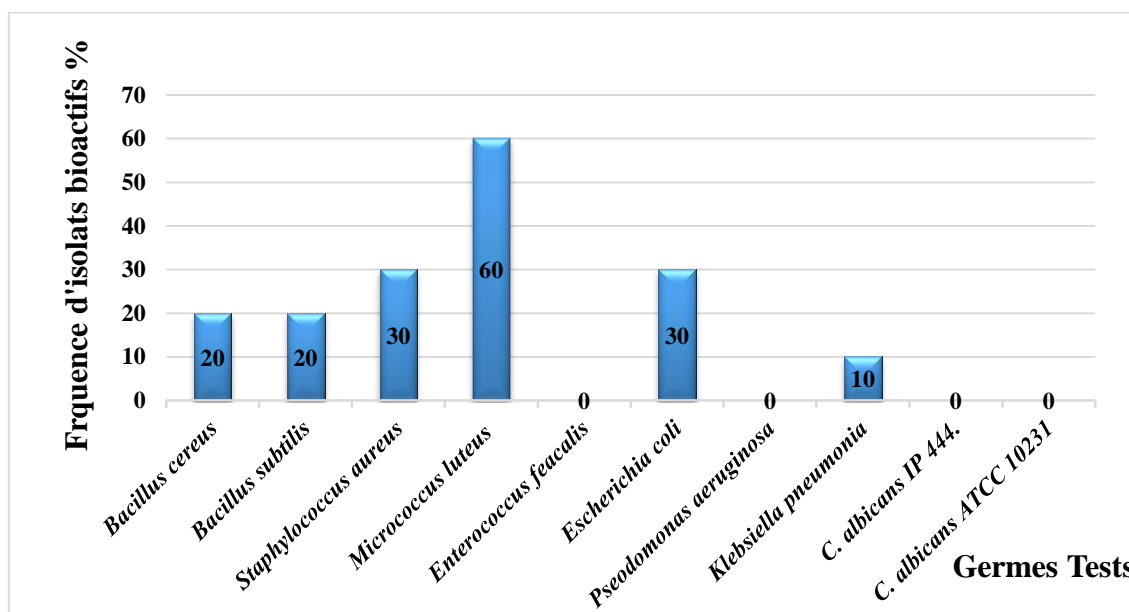
Germes tests	Bc	Bs	Ef	Sa	MI	Ec	Kp	Ps	Ca444	Ca10
<b>Isolats</b>										
LMB3S01	11	11	-	20	21	11	09	-	-	-
LMB3S03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMB3S04	11	9	-	22	19	10	-	-	-	-
LMB3S15	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-
LMB3S16	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-
LMB3S18	-	-	-	15	24	8	-	-	-	-
LMB3S20	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-
LMB3S23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMB3S25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMB3S29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Bc** : *Bacillus cereus*, **Bs** : *Bacillus subtilis*, **Ef** : *Enterococcus faecalis*, **Sa** : *Staphylococcus aureus*, **MI** : *Micrococcus luteus*, **Ec** : *Escherichia coli*, **Kp** : *Klebsiella pneumonia*, **Ps** : *Pseudomonas aeruginosa*, **Ca10** : *Candida albicans* ATCC 10231, **Ca444** : *Candida albicans* IP 444.

La réponse des germes tests aux activités antimicrobiennes produites par les isolats varie également d'un germe test à un autre. Le graphe illustré dans la **figure 4** présente la fréquence des isolats bioactifs vis-à-vis chaque germe test. Il montre que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles que les bactéries à Gram négatif dont l'espèce *Micrococcus luteus*, est la plus inhibée avec 60% des isolats (6 isolats) provoquant l'inhibition. *Staphylococcus aureus* suit avec une inhibition par 30% des isolats (3 isolats).

Parmi les bactéries à Gram négatif, *E. coli* est l'espèce la plus inhibée, étant affectée par 30% des isolats (soit 3 isolats). En revanche, l'espèce bactérienne la moins inhibée est *Klebsiella pneumonia*, qui n'a été inhibée que par un seul isolat.

Aucune activité n'a été remarquée vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis*.



**Figure 4 :** Fréquence des isolats producteurs activité antimicrobienne vis-à-vis chaque germe test.

Les résultats du screening primaire des activités antimicrobiennes par la technique de cylindres d'agar révèlent que l'isolat **LMB3S01** est le plus prometteur en termes de production d'activités antimicrobiennes. Il démontre un large spectre antibactérien et génère des zones d'inhibition significatives.

### **I. 1. 2. Recherche de la production des activités antimicrobiennes sur milieu liquide (Submerged fermentation SmF).**

Les isolats exerçant une activité inhibitrice de la croissance des germes tests par la technique des cylindres d'agar ont été choisis pour chercher la production des activités antimicrobiennes sur milieu liquide. Il s'agit de LMB3S01, LMB3S04, LMB3S15, LMB3S16, LMB3S18 et LMB3S20. Leurs surnageants ont été récupérés par centrifugation à 3000 t/min pendant 20 minutes à partir des cultures de 7 jours sur Bouillon Nutritif supplémenté de 15% de NaCl. L'activité antimicrobienne a été recherchée, par la technique des puits, vis-à-vis les 10 germes utilisés précédemment.

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition sont présentés dans le **tableau 3**, il apparaît que seulement 3 surnageants ont exercé un pouvoir inhibiteur, à savoir le surnageant de l'isolat LMB3S01, LMB3S04, et LMB3S15.

Quant au surnageants des isolats LMB3S01 et LMB3S15 ont inhibé seulement *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*. En revanche, le surnageant de l'isolat LMB3S04 a inhibé *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*.

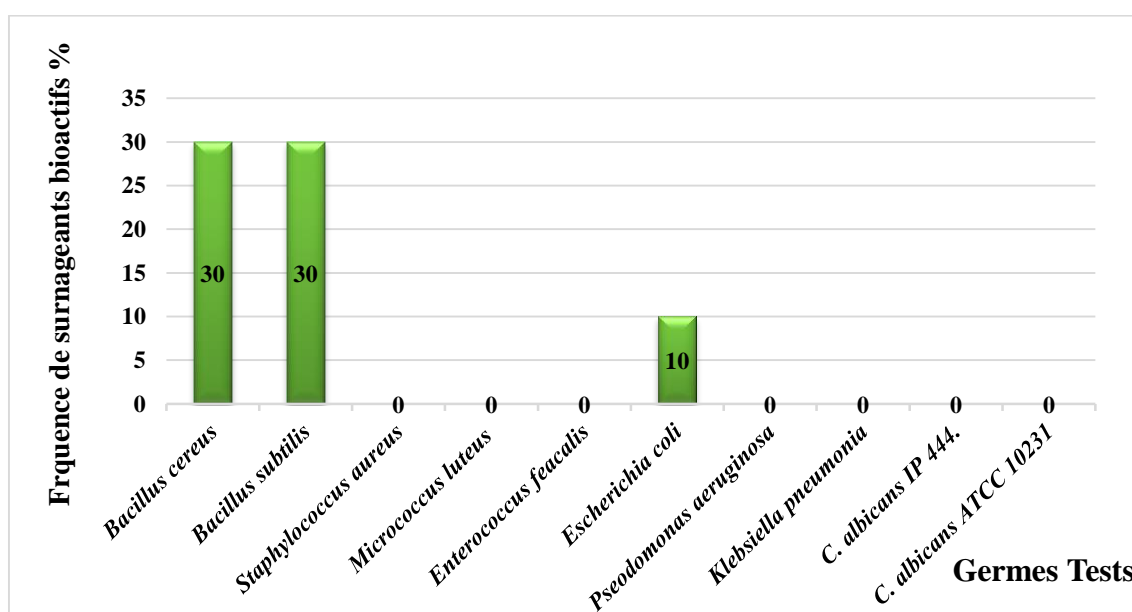
Le diamètre le plus important est de 14 mm, il a été obtenu vis-à-vis *Bacillus cereus* et *E. coli* respectivement par les isolats LMB3S01 et LMB3S04

**Tableau 3 :** Diamètres des zones d'inhibition en millimètre (mm) obtenus à partir du screening primaire des activités antimicrobiennes des isolats sur milieu liquide.

Germes tests	Bc	Bs	Ef	Sa	MI	Ec	Kp	Ps	Ca444	Ca10
<b>Isolats</b>										
<b>LMB3S01</b>	14	11	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>LMB3S04</b>	13	11	-	-	-	14	-	-	-	-
<b>LMB3S15</b>	08	09	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>LMB3S16</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>LMB3S18</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>LMB3S20</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Bc :** *Bacillus cereus*, **Bs :** *Bacillus subtilis*, **Ef :** *Enterococcus faecalis*, **Sa :** *Staphylococcus aureus*, **MI :** *Micrococcus luteus*, **Ec :** *Escherichia coli*, **Kp :** *Klebsiella pneumonia*, **Ps :** *Pseudomonas aeruginosa*, **Ca10 :** *Candida albicans* ATCC 10231, **Ca444 :** *Candida albicans* IP 444.

Le graphe illustré dans la **figure 5** présente la fréquence d'inhibition des germes test par les surnageants des isolats.



**Figure 5 :** Fréquence des surnageants actives vis-à-vis les germes tests.



### I. 1. 3. Extraction des métabolites antimicrobiens de l'isolat à partir du milieu solide

L'isolat LMB3S01 a été sélectionné pour extraire ces composés antimicrobiens. L'extraction a été réalisée à partir d'une culture sur milieu gélosé Gélose Nutritive à 15% de NaCl. Trois solvants de polarité différente ont été utilisés : le méthanol, l'acétate d'éthyle et le chloroforme. Le pouvoir antimicrobien de tous les extraits obtenus a été testé à l'aide de la méthode des disques en papier. Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont représentés dans le **tableau 4**.

**Tableau 4** : Diamètres des zones d'inhibition des différents extraits par la technique des disques en papier.

Les germes test	Diamètres des zones d'inhibition (mm)		
	Chloroforme	Acétate d'éthyle	Méthanol
<i>Bacillus cereus</i>	6 mm	7 mm	9 mm
<i>Bacillus subtilus</i>	7 mm	8 mm	-
<i>Satphylococcus aureus</i>	7 mm	8 mm	10 mm
<i>Micrococcus luteus</i>	10 mm	11 mm	14 mm
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	11mm		

D'après les résultats obtenus, il apparaît que les trois extraits de l'isolat LMB3S01 (chloroformique et d'acétate d'éthyle et méthanolique) ont montré un pouvoir inhibiteur vis-à-vis les germes testés *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilus*, *Satphylococcus aureus*, et *Micrococcus luteus*, mais avec des diamètres moins importants par rapport à ceux obtenus par le contact direct (technique de cylindre d'agar). En ce qui concerne le germe *Klebsielle pneumonie*, seul l'extrait chloroformique a exercé une inhibition. Aucun effet inhibiteur n'a été enregistré contre *Escherichia coli*.

## I. 2. Discussion

Dans cette première partie de notre mémoire, nous avons effectué un screening primaire pour évaluer le pouvoir antimicrobien de dix isolats provenant de la grande sebkhia d'Oran contre des germes de référence appartenant à différents groupes : bactéries Gram-positives, bactéries Gram-négatives et levures.

La méthode employée pour le screening primaire est la technique des cylindres d'agar, une méthode de diffusion en milieu gélosé. Cette technique est fortement recommandée pour

mettre en évidence l'antagonisme entre les microorganismes (**Botta et al., 2020; Anteneh et al., 2021; Nas et al., 2021**). Outre sa simplicité, elle permet de tester l'activité de plusieurs isolats vis-à-vis du même germe test sur une même boîte de Pétri, par contact directe et en un temps court.

Les résultats obtenus du screening primaires ont révélé que sur les 10 isolats, 6 isolats sont actives sur aux moins un germes test. 3 isolats produisent à la fois des activités à l'égard des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Aucun germe n'a montré une activité antifongique. Les espèces bactériennes les plus sensibles sont *Micrococcus luteus*, suivis par *Staphylococcus aureus*.

Les germes test utilisés ont été choisis de façon à obtenir un représentant de chaque classe. Les espèces *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* ont été utilisées dans diverse études portant sur la recherche de composés bioactifs à partir des microorganismes (**Aouiche et al., 2014; Anteneh et al., 2021 ; Nas et al., 2021 ; Saibi et al., 2022**). Ces espèces font partie du groupe **SKAPE** qui constitue le plus grand risque parmi les agents pathogènes humains. Ce groupe comprend *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* *Acinetobacter baumannii*, et *Enterococcus faecium* (**Corral et al., 2019**).

En ce qui concerne les isolats n'ayant montré aucun pouvoir inhibiteur contre les germes testés, plusieurs hypothèses sont possibles. Cela pourrait être dû à l'absence de cibles spécifiques chez les germes testés ou à une production de composés antimicrobiens insuffisante pour atteindre le seuil d'inhibition, c'est-à-dire la concentration minimale inhibitrice pour chaque microorganisme testé. L'absence d'activité antimicrobienne peut également être attribuée à la présence de mécanismes de résistance chez les germes testés, inhibant ces activités antimicrobiennes même si elles sont produites en quantités suffisantes.

De nombreuses analyses des séquences de génomes microbiens complets ont révélé la présence d'un large éventail de gènes biosynthétiques silencieux, codant pour de nombreux composés qui ne s'expriment pas dans des conditions de culture standard en laboratoire (**Chiang et al., 2011 ; Okada et Seyedsayamdost, 2017 ; Sun et al., 2021**). Pour surmonter ces limitations et induire l'expression de ces gènes silencieux, plusieurs approches peuvent être employées, telles que la modification des conditions de culture et l'ajout de facteurs stimulants. La méthode la plus prometteuse est la co-culture, qui peut imiter l'environnement microbien naturel et activer les gènes biosynthétiques silencieux grâce à des stimulants environnementaux. Les signaux chimiques libérés par d'autres microbes peuvent déclencher diverses réponses de défense, notamment la synthèse de métabolites secondaires variés et la production d'enzymes

extracellulaires et plusieurs études ont montré le succès de cette approche (Wu *et al.*, 2018 ; Aissaoui *et al.*, 2019 ; Karupiah *et al.*, 2019 ; Sun *et al.*, 2021).

Les six isolats (LMB3S01, LMB3S04, LMB3S15, LMB3S16, LMB3S18 et LMB3S20) ayant démontré des activités inhibitrices lors du screening primaire à l'aide de la technique des cylindres d'agar ont été sélectionnés pour évaluer l'activité antimicrobienne de leurs surnageants vis-à-vis les mêmes germes testés. Les résultats obtenus se sont révélés complètement différents. Les surnageants des isolats LMB3S16, LMB3S18 et LMB3S20 n'ont montré aucun effet inhibiteur, bien que lors du screening par la technique des cylindres d'agar, ces trois isolats aient présenté un pouvoir inhibiteur contre *Micrococcus luteus*. De plus, LMB3S18 avait également inhibé les germes *Staphylococcus aureus* et *E. coli* avec des diamètres de zone d'inhibition significatifs (**Tableau 2**).

En comparant les résultats de la production des activités sur milieu gélosé et sur milieu liquide, on observe également une absence d'expression des activités inhibitrices de la croissance de *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus* dans les surnageants des isolats LMB3S01 et LMB3S04, bien que ces isolats aient montré des activités inhibitrices significatives avec la technique des cylindres d'agar. En revanche, les activités inhibitrices contre *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* ont été produites, avec des diamètres d'inhibition supérieurs ou égaux à ceux obtenus par la technique des cylindres d'agar.

Les activités inhibitrices contre *Klebsiella pneumoniae*, exprimées par l'isolat LMB3S01 avec la technique des cylindres d'agar, n'ont pas été exprimées en milieu liquide. Concernant *E. coli*, le surnageant de l'isolat LMB3S01 n'a exercé aucun effet inhibiteur, bien que l'isolat lui-même ait démontré un pouvoir inhibiteur avec un diamètre de 11 mm par la technique des cylindres d'agar. En revanche, le surnageant de l'isolat LMB3S04 a exercé un effet inhibiteur plus important que celui obtenu par la même technique. L'isolat LMB3S15 n'a montré aucun effet inhibiteur contre *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*, tandis que son surnageant a révélé un effet inhibiteur avec des diamètres d'inhibition plus ou moins importants.

À partir de ces résultats, nous constatons l'impact significatif de la consistance du milieu de culture (solide ou bouillon) sur la production et la diffusion des activités antimicrobiennes de nos isolats. Ces observations nous permettent de conclure que le type de fermentation (sur milieu solide à faible activité d'eau ou sur milieu liquide) exerce une influence déterminante sur la production de métabolites par les microorganismes.

En général, la fermentation en milieu solide est adaptée aux microorganismes cultivés dans des conditions aérobies avec une faible activité en eau. L'oxygène étant directement fourni aux microorganismes, leurs besoins énergétiques sont relativement réduits. Par conséquent, la

production de métabolites secondaires est significativement augmentée, avec des rendements bien plus élevés et en un temps plus court (**Al-Ansari et al., 2019**).

**Hosny et al. (2011)** ont observé des résultats analogues avec leur isolat bactérien provenant de la mer Méditerranée, identifié comme *Bacillus licheniformis* NRC-18. Cette souche est capable de produire des substances antimicrobiennes exclusivement en milieu solide. Ils ont attribué cette particularité à l'incapacité des composés antimicrobiens produits par cette bactérie de se diffuser dans un environnement aqueux.

Dans leur étude comparative utilisant la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), **Kibret et ses collaborateurs (2018)** ont identifiés de nouveaux métabolites secondaires dans les extraits de *Streptomyces spp* obtenus à partir de milieu gélosé par rapport au milieu liquide.

Un autre exemple remarquable est la conoïcétine, un antibiotique efficace contre les bactéries et les champignons ainsi que contre *Staphylococcus aureus* multi-résistants. Cet antibiotique est produit par l'ascomycète *Coniochaeta ellipsoidea* en fermentation solide alors que sur milieu liquide ce champignon ne l'a jamais produit malgré une bonne croissance (**Kumar et al., 2021**).

Sur la base des résultats du screening primaire des activités antimicrobiennes et en tenant compte des observations antérieures sur l'impact du type de fermentation (solide ou liquide) sur la production d'antimicrobiens, nous avons sélectionné l'isolat LMB3S01 pour extraire ses activités antimicrobiennes à partir de sa culture sur milieu solide. Nous avons utilisé une série de solvants de différentes polarités : chloroforme, acétate d'éthyle et méthanol. Les trois extraits obtenus ont démontré un effet inhibiteurs vis-à-vis les germes précédemment testés bien que les zones d'inhibition observées aient été significativement plus petites que celles obtenues par la méthode des cylindre d'agar. Cette diminution pourrait s'expliquer par une extraction ou une concentration inefficace des métabolites actifs produits par les solvants utilisés. Ainsi, il est nécessaire d'explorer d'autres types de solvants pour optimiser cette extraction.

L'isolat LMB3S01 a été également retenu pour faire l'objet d'une caractérisation phénotypique dans la phase suivante de notre étude.

## **II. Caractérisation phénotypique de l'isolat LMB3S01**

### **II. 1. Résultats**

La caractérisation de l'isolat LMB3S01 a été effectuée selon les tests proposés par **Logan et al. (2009)**.

#### **II. 1. 1. Caractères microscopiques et macroscopiques**

Les caractères microscopiques ont été déterminés après 24 heures d'incubation à 30°C sur Gélose Nutritive à 15% de NaCl (p/v) par un état frais et après coloration de Gram.

L'observation au microscope optique de l'état frais (objectif X40) a montré que les cellules sont des bâtonnets mobiles.

L'observation des cellules fixées, après coloration de Gram a été effectuée à objectif 100 à immersion, elle a montré que les cellules de l'isolat LMB3S01 possèdent la forme bâtonnet, elles sont soit isolées ou formant de chainettes avec un type de paroi à Gram positif.

Les caractères macroscopique ont été également déterminé après 24 heures d'incubation à 30°C sur Gélose Nutritive à 15% de NaCl (p/v), l'isolat LMB3S01 donne de colonies de 3 à 4 mm de diamètre non odorantes, à surface bombée, lisse et brillante avec un contour régulier, translucides de couleur beige avec une consistance muqueuse.

La **figure** montre l'aspect des cellules (examen microscopique) et des colonies (examen macroscopique) de l'isolat LMB3S01



**Figure 6** : l'aspect des cellules (A) et des colonies (B) de l'isolat LMB3S01 après 24 heures d'incubation à 30°C sur Gélose Nutritive à 15% de NaCl.

## II. 1. 2. Caractérisation physiologique

La caractérisation physiologique a été déterminée en suivant quotidiennement durant 72 heures leur croissance 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 5**, ils montrent que l'isolat a poussé sur tous les intervalles de salinité, de pH et de Température explorés.

**Tableau 5** : intervalles de salinité, de température et de pH permettant la croissance des isolats.

<b>Paramètres de croissance</b>	<b>LMB3S01</b>
<b>Concentration de NaCl (%)</b>	<b>0 à 30%</b>
<b>Optimum de concentration de NaCl de croissance</b>	<b>15%</b>
<b>Température (°C)</b>	<b>25 à 55°C</b>
<b>Optimum de température de croissance</b>	<b>30°C - 37°C</b>
<b>pH</b>	<b>5 à 9</b>
<b>Optimum de pH de croissance</b>	<b>6 - 7</b>

## II. 1. 3. Caractérisation biochimique

L'étude du profil biochimique et des propriétés métaboliques de l'isolat a été effectuée en utilisant les systèmes API 20E et ID 32E, et d'autres techniques de la microbiologie classique pour la recherche de la catalase, le cytochrome oxydase, la mobilité et la dégradation du mannitol sur le milieu Mannitol-Mobilité et le type respiratoire sur milieu VF.

D'après les résultats de la galerie API® 20E ont montré que l'isolat LMB3S01 utilise tous les sucres de la galerie. Il ne possède pas la  $\beta$ -galactosidase, l'Arginine dihydrolase, la Lysine décarboxylase, l'Ornithine décarboxylase, l'Uréase la Tryptophane désaminase, et la Gélatinase. Il est incapable de produire l'acétoïne, l'indole et l' $H_2S$ , et n'utilise pas le citrate Simmons. Les résultats de la galerie ID32 confirment celles de la galerie API pour la dégradation des sucres. Ils montrent également la production des enzymes  $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -Glucuronidase,  $\alpha$ - et  $\beta$ - Glucosidase, et la N-Acétyl- $\beta$ -Glucosaminidase. par l'isolat LMB3S01. Les résultats des différents caractères biochimiques étudiés sont représentés dans le **tableau 6** et la **figure 7**.

**Tableau 6** : Caractères biochimiques de l'isolat LMB3S01

La galerie ID 32							
ODC	-	RP	-	IND	-	$\alpha$ GAL	+
ADH	-	$\beta$ GLU	+	$\beta$ NAG	-	TRE	-
LDC	-	MAN	+	$\beta$ GAL	+	RHA	+
URE	+	MAL	-	GLU	+	INO	+
LARL	-	ADO	-	SAC	+	CEL	-
GAT	-	PLE	-	LARA	+	SOR	+
5KG	-	$\beta$ GUR	+	DAL	+	$\alpha$ MAL	-
LIP	+	MNT	+	$\alpha$ GLU	-	AspA	+
La galerie API 20 <sup>E</sup>							
ONPG	-	H <sub>2</sub> S	-	GEL	-	RHA	+
ADH	-	URE	-	GLU	+	SAC	+
LDC	-	TDA	-	MAN	+	MEL	+
ODC	-	Indole	-	INO	+	1AMY	+
CIT	-	VP	-	SOR	+	ARA	+
Autres tests							
Catalase	+		Oxydase	+			
Mannitol-Mobilité	+ / +		Type respiratoire	Aérobie Stricte			



**A.** Résultat du test ‘catalase’



**B.** Résultat du test ‘cytochrome oxydase’



**C.** Résultat du test ‘Manitol-Mobilité’



**D.** Résultat du type respiratoire



**E.** Résultat de la caractérisation par la galerie API 20E



**F.** Résultat de la caractérisation par la galerie ID 32

**Figure 7 :** Résultats de la caractérisation biochimique (A, B, C, D, E, F) de l’isolat LMB3S01



#### II. 1. 4. Étude de la sensibilité de l'isolat aux antibiotiques

La sensibilité de l'isolat aux antibiotiques a été testée sur le milieu gélosé Muller-Hinton à 15% de NaCl (p/v) en utilisant les antibiotiques suivants : Fosfomycine (50 µg), Kanamycine (30 µg), Vanomycine (30 µg), Tobramycine (10 µg) et Amoxicilline (30 µg). En comparant les diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les valeurs critiques données par **CA-SFM (2023)**, il s'avère que notre isolat est résistant à la Fosfomycine, l'Amoxicilline et à la Vanomycine. Sa sensibilité est enregistrée avec les antibiotiques Kanamycine et Tobramycine. Les diamètres lus sont représentés dans le **tableau 7**.

**Tableau 7** : Résultats de l'antibiogramme de l'isolat LMB3S01

Antibiotique	Sigle	Charge de disque	Diamètres lus
Amoxicilline	AMC	30	Résistante
Vanomycine	VA	30	Résistante
Fosfomycine	FF	50	14 mm (Résistante)
Kanamycine	K	30	28 mm (Sensible)
Tobramycine	TOB	10	12 mm (Sensible)

#### II. 2. Discussion

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la caractérisation, sur le plan phénotypique, de l'isolat LMB3S01 selon les recommandations de **Logan et al. (2009)** pour la description de nouveaux taxons aérobies. Cet isolat a été sélectionné en se basant sur son potentiel intéressant de production des activités antimicrobiennes par rapport aux autres isolats.

Nous avons initié la caractérisation par un examen microscopique, à la fois à l'état frais et après coloration de Gram. Cet examen a révélé que les cellules de l'isolat LMB3S01 apparaissent sous forme de bacilles à Gram positif et mobiles.

L'étude de la croissance de l'isolat a été effectuée sur milieu gélosé contenant des concentrations croissantes de NaCl allant de 0 jusqu'à 30%. La croissance de l'isolat a été observée en l'absence de NaCl ainsi qu'à une de 30% (point de saturation). Selon la classification de **Rahman et al. (2017)**, ce résultat permet de classer cet isolat parmi les halotolérants extrêmes. Ce résultat contredit les études antérieures, qui indiquent généralement que les bactéries halotolérantes et halophiles sont plutôt modérément tolérantes au sel, alors que l'halotolérance extrême est typiquement associée aux archées.

La première concentration qui a favorise la croissance de l'isolat est de 15% de NaCl, ce qui en fait la concentration optimale pour la croissance de l'isolat. Cette concentration correspond à la concentration saline utilisée dans le milieu de culture de son isolement.

L'intervalle de la température de croissance de notre isolat s'étend de 25 à 55°C avec un optimum observé entre 30 à 37°C. Un caractère qui selon **Bowers et al. (2009)** lui permet de rejoindre la catégorie des bactéries thermo-tolérantes.

Notre isolat s'avérait avoir une croissance optimale à des pH neutres et proches de l'alcalinité. Ce profil correspond à celui des espèces alcali-tolérantes qui croissent de façon optimale proche de la neutralité et tolèrent des pH alcalins (**Bowers et al., 2009**).

La tolérance des microorganismes halophiles ou halotolérants au pH peut s'étendre sur des intervalles larges de pH, ce qui signifie qu'ils peuvent se développer également à des pH acides grâce à d'autres mécanismes d'acidotolérance comme exemple l'accumulation de solutés compatibles et de protons H<sup>+</sup> (**Lewinson et al., 2004**). Ce qui peut expliquer probablement la tolérance de notre isolat à un pH acide égal à 5

La combinaison des caractères de l'halotolérance extrême, l'alcali-tolérance et la thermo-tolérance chez notre isolat permet de le qualifier comme poly-extrêmophile selon **Mesbah et al. (2009)**.

Les caractères biochimiques de l'isolat ont été déterminés en utilisant des méthodes classiques de la microbiologie et les systèmes miniaturisés API 20E et ID 32. L'isolat possède la catalase, et le cytochrome oxydase, et il a un type respiratoire aérobie strict.

Les systèmes API 20E et ID32 ont fait apparaitre un pouvoir métabolique intéressant. La galerie API 20E est largement utilisée dans le but de déterminer les profils biochimiques des espèces halophiles et halotolérant isolés à partir des habitats salins (**Phillip et al., 2012 ; NAS et al., 2021 ; Saibi et al., 2022**)

En ce qui concerne le profil de sensibilité aux antibiotiques, l'isolat a montré une sensibilité à la Kanamycine et Tobramycine et une résistance à la Fosfomycine, Vancomycine et Amoxicilline. **Singh et Jha (2016)**, dans leur étude ont isolé à partir des eaux du lac de Sambhar, une souche de *Bacillus licheniformis* HSW-16 halotolérante qui est résistante à la Kanamycine et à la vancomycine.

# **Conclusion et perspectives**

## *Conclusion et perspectives*

L'objectif principal de ce travail était d'une part de réaliser une évaluation de la production des activités antimicrobiennes d'un ensemble de dix (10) souches isolées de la grande sebkha d'Oran sur une concentration de 15% de NaCl (p/v) et d'autre part l'étude des caractères phénotypiques de l'isolat le plus prometteur. Ainsi plusieurs points ont été abordés pour atteindre cet objectif.

Dans un premier temps, un screening primaire des activités antibactérienne et antifongique a été réalisé vis-à-vis des germes de référence (bactéries et levures). La production de ces activités a été évaluée à partir des cultures des isolats sur milieu solide (fermentation sur Gélose Nutritive) et liquide (fermentation sur Bouillon nutritif), en utilisant respectivement les techniques des cylindres d'agar et des puits.

La technique des cylindres d'agar, où les germes test sont en contact directe avec les isolats, a révélé que six (6) sur dix (10) isolats présentaient un effet inhibiteur sur la croissance d'au moins d'une bactérie. En revanche, l'évaluation des activités antimicrobiennes dans les surnageants des isolats, en appliquant la technique des puits, n'a démontré un pouvoir inhibiteur que pour trois isolats. Aucune activité antifongique n'a été détectée pour les deux types de fermentation.

Selon les résultats du screening primaire des activités, l'isolat LMB3S01 a été sélectionné pour l'extraction de ses activités et pour une caractérisation phénotypique. Cet isolat a démontré un effet inhibiteur supérieur par rapport aux autres isolats avec un large spectre d'action et des diamètres des zones d'inhibition significatifs obtenus, notamment à partir de sa fermentation sur milieu solide vis-à-vis *Micrococcus luteus* (21 mm) *Staphylococcus aureus* (20 mm).

L'étude de la production des activités antimicrobiennes sur milieu liquide et sur milieu solide a montré révélée également que la fermentation sur milieu solide est largement plus rentable bien que cette technique est très négligée en comparant avec la fermentation sur milieu liquide, qui constitue la technique la plus couramment utilisée dans les études s'intéressant à la recherche des activités antimicrobiennes.

L'extraction des activités antimicrobiennes de l'isolat a été effectuée à partir de sa culture sur milieu gélosé (Gélose nutritive à 15% NaCl) en utilisant trois solvants organiques de polarité différente : le méthanol, l'acétate d'éthyle et le chloroforme. Les trois extraits obtenus ont démontré un effet inhibiteurs vis-à-vis les germes testés mais avec des zones d'inhibition moins importantes que celles obtenues dans le screening primaire par la méthode des cylindre d'agar.

## *Conclusion et perspectives*

La caractérisation phénotypique l'isolat LMB3S01 a été réalisée en examinant ses caractéristiques microscopiques, macroscopiques, physiologiques et biochimiques. L'analyse microscopique a révélé qu'il s'agit d'un bacille Gram positif et mobile. Les caractéristiques physiologiques ont été déterminées en cultivant l'isolat sous diverses conditions physicochimiques, incluant des concentrations de NaCl de 0 à 30 %, des températures de 25 à 55°C, et des pH de 4 à 9. LMB3S01 s'est avéré être un isolat poly-extrêmophile, démontrant une halotolérance extrême (croissance à 30% de NaCl), une thermo-tolérance (croissance à 55°C) et une alcali-tolérance (croissance à pH = 9).

Les caractéristiques biochimiques ont été déterminés à l'aide des techniques de microbiologie classique et par le système API 20E et ID32. L'isolat possède la catalase et l'oxydase, il a un type respiratoire aérobie strict. Sa croissance sur mannitol-mobilité a confirmé sa mobilité et mettre en évidence le caractère Mannitol positif. Les systèmes API 20E et ID32 ont démontré un profil métabolique et enzymatique étendu, l'isolat ayant utilisé la majorité des sucres et substrats des galeries.

Les résultats acquis au cours de cette étude, nous incite à

- Tester le pouvoir antimicrobien de l'isolat vis-à-vis d'autres germes d'intérêt médical.
- Optimiser les conditions de production en utilisant des stimulateurs dans le milieu de culture ou d'autres approches comme la co-culture sur milieu liquide.
- Essayer d'autres solvants organiques pour l'extraction des activités antimicrobiens.
- faire une purification et une étude structurale des activités antimicrobiennes produites par le biais des techniques de chimie analytique tels que la chromatographie en phase gazeuse ou liquide couplée à la spectroscopie de masse.
- Poursuivre l'identification de l'isolat par des techniques moléculaire tel que le séquençage de l'ARN et l'hybridation ADN-ADN.

**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. **Abbamondi, G. R., Kambourova, M., Poli, A., Finore, I., & Nicolaus, B. (2019).** Quorum Sensing in Extremophiles. *Quorum Sensing*, 97–123. doi:10.1016/b978-0-12-814905-8.00004-6.
3. **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>.
4. **Aissaoui, N., Mahjoubi, M., Nas, F., Mghirbi, O., Arab, M., Souissi, Y., Hoceini, A., Masmoudi, A. S., Mosbah, A., Cherif, A., & Klouche-Khelil, N. (2018).** Antibacterial potential of 2,4-Di-tert Butylphenol and Calixarene-based prodrugs from thermophilic *Bacillus licheniformis* isolated in algerian hot spring. *Geomicrobiology Journal*. 1-10. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1503377>.
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. **Akpolat, C., Ventosa, A., Birbir, M. E. R. A. L., Sánchez-Porro, C., & Caglayan, P. (2015).** Molecular identification of moderately halophilic bacteria and extremely halophilic archaea isolated from salted sheep skins containing red and yellow discolorations. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 110(07), 211-226.
7. **Al-Ansari, M., Alkubaisi, N., Vijayaragavan, P., & Murugan, K. (2019).** Antimicrobial potential of *Streptomyces* sp. to the Gram positive and Gram negative pathogens. *Journal of infection and public health*, 12(6), 861–866. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.05.016>.
8. **Al-Araji, L. Abd Rahman, R. N. Z. R., Basri, M. & Salleh, A. B. (2007).** Microbial Surfactant. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 15 (3) : 99-105.

## *Références bibliographiques*

9. **Anteneh, Y. S., Yang, Q., Brown, M. H., & Franco, C. M. M. (2021).** Antimicrobial Activities of Marine Sponge-Associated Bacteria. *Microorganisms*, 9(1), 171. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010171>
10. **Aouiche, A., Bijani, C., Zitouni, A., Mathieu, F., & Sabaou, N. (2014).** Antimicrobial activity of saquayamycins produced by *Streptomyces* spp. PAL114 isolated from a Saharan soil. *Journal de mycologie medicale*, 24(2), e17–e23. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2013.09.001>.
11. **Arundhati, P., Biswas, A., Chatterjee, S., & Paul, A. K. (2015).** Optimization of Cultural Conditions for Production of Exopolysaccharide by *Halomonas marina* HMA 103 under Batch-Culture. *American Journal of Microbiology*, 6 (2), 31-39. <https://doi.org/10.3844/ajmsp.2015.31.39>.
12. **Auckloo, B. N., & Wu, B. (2016).** Antibiotics derived from marine organisms: their chemistry and biological mode of action. *Studies in Natural Products Chemistry*, 51, 483-515. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63932-5.00010-3>.
13. **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>.
14. **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.
15. **Biswas, J., & Paul, A. K. (2014).** Production of Extracellular Polymeric Substances by Halophilic Bacteria of Solar Salterns. *Chinese Journal of Biology*, 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/205731>.
16. **Botta, L., Saladino, R., Barghini, P., Fenice, M., & Pasqualetti, M. (2020).** Production and identification of two antifungal terpenoids from the *Posidonia oceanica* epiphytic Ascomycota *Mariannaea humicola* IG100. *Microbial cell factories*, 19(1), 184. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01445-7>
17. **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>.



## *Références bibliographiques*

18. **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.
19. **Charlesworth, J. C., & Burns, B. P. (2015).** Untapped Resources: Biotechnological Potential of Peptides and Secondary Metabolites in *Archaea*. *Archaea* (Vancouver, B.C.), 2015, 282035. <https://doi.org/10.1155/2015/282035>.
20. **Chiang, Y. M., Chang, S. L., Oakley, B. R., & Wang, C. C. (2011).** Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms. *Current opinion in chemical biology*, 15(1), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.10.011>.
21. **Cho, E. S., Cha, I. T., Roh, S. W., & Seo, M. J. (2021).** *Haloferax litoreum* sp. nov., *Haloferax marinisediminis* sp. nov., and *Haloferax marinum* sp. nov., low salt-tolerant haloarchaea isolated from seawater and sediment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 114(12), 2065–2082. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01661-0>.
22. **CLSI M02-A12. (2015).** Performance Standards for antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standards - Twelfth Edition. CLSI Document M02-A12. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute.
23. **Corral, P., Amoozegar, M. A., & Ventosa, A. (2019).** Halophiles and Their Biomolecules: Recent Advances and Future Applications in Biomedicine. *Marine drugs*, 18(1), 33. <https://doi.org/10.3390/md18010033>.
24. **DasSarma, S. & DasSarma, P. (2012).** Halophiles. In eLS, (John Wiley & Sons, Ltd), New York. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000394.pub4>.
25. **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).
26. **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>.
27. **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>

## *Références bibliographiques*

28. **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>.
29. **Fisher, L. A., Pontefract, A., Som, M. S., Carr, C. E., Klempay, B., Schmidt, B. E. B., Bowman J. S. & Bartlett, D. H. (2021).** Current state of athalassohaline deep-sea hypersaline anoxic basin research recommendations for future work and relevance to astrobiology. *Environmental Microbiology*, 23(7), 3360-3369. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15414>.
30. **Gad, A. M., Beltagy, E. A., Abdul-Raouf , U. M., El-Shenawy, M. A., Abouelkheir, S. S. (2016).** Screening of marine fatty acids producing bacteria with antimicrobial capabilities. *Chemistry of Advanced Materials*. 1: 41-54.
31. **Giani, M., Pire, C., & Martínez-Espinosa, R. M. (2024).** Bacterioruberin: Biosynthesis, Antioxidant Activity, and Therapeutic Applications in Cancer and Immune Pathologies. *Marine drugs*, 22(4), 167. <https://doi.org/10.3390/md22040167>.
32. **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 bacterial communities from commercial salts. *Frontiers in microbiology*, 8, 799. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00799>.
33. **Gomri, M.A., Bentaleb, A., Bouchekrit, 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>.
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. **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>.
37. **Hamedi, J., Mohammadipannah, F., Ventosa, A. 2013.** Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. *Extremophiles*, 17(1), 1-13.

## *Références bibliographiques*

38. Hänel, I., & Müller, V. (2013). Molecular Mechanisms of Adaptation of the Moderately Halophilic Bacterium *Halobacillus halophilus* to Its Environment. *Life (Basel, Switzerland)*, 3(1), 234–243. <https://doi.org/10.3390/life3010234>.
39. Harizani, M., Katsini, E., Georgantea, P., Roussis, V., & Ioannou, E. (2020). New Chlorinated 2,5-Diketopiperazines from Marine-Derived Bacteria Isolated from Sediments of the Eastern Mediterranean Sea. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25 (7), 1509. <https://doi.org/10.3390/molecules25071509>.
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. Hegazy, G. E., Abu-Serie, M. M., Abo-Elela, G. M., Ghozlan, H., Sabry, S. A., Soliman, N. A., & Abdel-Fattah, Y. R. (2020). In vitro dual (anticancer and antiviral) activity of the carotenoids produced by haloalkaliphilic archaeon *Natrialba* sp. M6. *Scientific Reports*, 10(1), 5986. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62663-y>.
43. Hosny A. E. D. M. S, Sheir, D. H., & Eldewany, A. I. (2011). Production of antimicrobial agent from marine bacteria isolated from Mediterranean. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(5): 121-128.
44. Huang, X. F., Guan, W., Liu, J., Lu, L. J., Xu, J. C., & Zhou, Q. (2010). Characterization and phylogenetic analysis of bio emulsifier producing bacteria. *Bioresource technology*, 101(1), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.086>.
45. Jeong, S. W., & Choi, Y. J. (2020). Extremophilic Microorganisms for the Treatment of Toxic Pollutants in the Environment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(21), 4916. <https://doi.org/10.3390/molecules25214916>.
46. Karnwal, A., Shrivastava, S., Al-Tawaha, A. R. M. S., Kumar, G., Singh, R., Kumar, A., Mohan, A., Yogita, & Malik, T. (2023). Microbial Biosurfactant as an Alternate to Chemical Surfactants for Application in Cosmetics Industries in Personal and Skin Care Products: A Critical Review. *BioMed research international*, 2023, 2375223. <https://doi.org/10.1155/2023/2375223>.
47. Karuppiah, V., Vallikkannu, M., Li, T., & Chen, J. (2019). Simultaneous and sequential based co-fermentations of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 and

## *Références bibliographiques*

- Bacillus amyloliquefaciens* 1841: a strategy to enhance the gene expression and metabolites to improve the bio-control and plant growth promoting activity. *Microbial cell factories*, 18(1), 185. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1233-7>.
48. **Kibret, M., Guerrero-Garzón, J. F., Urban, E., Zehl, M., Wronski, V. K., Rückert, C., Busche, T., Kalinowski, J., Rollinger, J. M., Abate, D., & Zotchev, S. B. (2018).** *Streptomyces* spp. From Ethiopia Producing Antimicrobial Compounds: Characterization via Bioassays, Genome Analyses, and Mass Spectrometry. *Frontiers in microbiology*, 9, 1270. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01270>.
49. **Kim, H. Y., Heo, D. Y., Park, H. M., Singh, D., & Lee, C. H. (2016).** Metabolomic and Transcriptomic Comparison of Solid-State and Submerged Fermentation of *Penicillium expansum* KACC 40815. *PLoS ONE*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149012>.
50. **Kiplimo, D., Mugweru, J., Kituyi, S., Kipnyargis, A., & Mwirichia, R. (2019).** Diversity of esterase and lipase producing haloalkaliphilic bacteria from Lake Magadi in Kenya. *Journal of basic microbiology*, 59 (12), 1173–1184. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900353>.
51. **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>.
52. **Kumar, V., Ahluwalia, V., Saran, S., Kumar, J., Patel, A. K., & Singhanian, R. R. (2021).** Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. *Bioresource technology*, 323, 124566. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124566>.
53. **Kumar, V., Saxena, J., & Tiwari, S. K. (2016).** Description of a halocin-producing *Haloferax larsenii* HA1 isolated from Pachpadra salt lake in Rajasthan. *Archives of microbiology*, 198(2), 181–192. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1175-3>.
54. **La Cono, V., Bortoluzzi, G., Messina, E., La Spada, G., Smedile, F., Giuliano, L., Borghini, M., Stumpp, C., Schmitt-Kopplin, P., Harir, M., O'Neill, W. K., Hallsworth, J. E., & Yakimov, M. (2019).** The discovery of Lake Hephaestus, the youngest athalassohaline deep-sea formation on Earth. *Scientific reports*, 9 (1), 1679. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38444-z>.

## *Références bibliographiques*

55. Lalitha, P., Veena, V., Vidhyapriya, P., Lakshmi, P., Krishna, R., & Sakthivel, N. (2016). Anticancer potential of pyrrole (1, 2, a) pyrazine 1, 4, dione, hexahydro 3-(2-methyl propyl) (PPDHMP) extracted from a new marine bacterium, *Staphylococcus* sp. strain MB30. *Apoptosis : An International Journal On Programmed Cell Death*, 21(5), 566–577. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1221-x>.
56. 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.
57. Llamas, I., Amjres, H., Mata, J. A., Quesada, E., & Béjar, V. (2012). The potential biotechnological applications of the exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas almeriensis*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 17(6), 7103–7120. <https://doi.org/10.3390/molecules17067103>.
58. Logan, N. A., & Berkeley, R. C. (1984). Identification of *Bacillus* strains using the API system. *Journal of general microbiology*, 130 (7), 1871–1882. <https://doi.org/10.1099/00221287-130-7-1871>.
59. 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>.
60. Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 5(2), 73–83. <https://doi.org/10.1007/s007920100184>
61. Mesbah, N. M., Cook, G. M., & Wiegel, J. (2009). The halophilic alkalithermophile *Natranaerobius thermophilus* adapts to multiple environmental extremes using a large repertoire of Na(K)/H antiporters. *Molecular microbiology*, 74(2), 270–281. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06845.x>.
62. Moopantakath, J., Imchen, M., Anju, V. T., Busi, S., Dyavaiah, M., Martínez-Espinosa, R. M., & Kumavath, R. (2023). Bioactive molecules from *haloarchaea*: Scope and prospects for industrial and therapeutic applications. *Frontiers in microbiology*, 14, 1113540. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1113540>.
63. Moopantakath, J., Imchen, M., Siddhardha, B., & Kumavath, R. (2020). 16s rRNA metagenomic analysis reveals predominance of CrtI and CruF genes in Arabian Sea coast

## *Références bibliographiques*

- of India. *The Science of the total environment*, 743, 140699. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140699>.
64. **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>.
65. **Nas, F. (2022).** Recherche de souches extrêmophiles du genre *Bacillus* productrices de composés antimicrobiens issues de la Grande Sebkhah d'Oran. Thèse de doctorat, Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen.
66. **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>.
67. **Okada, B. K., & Seyedsayamdost, M. R. (2017).** Antibiotic dialogues: induction of silent biosynthetic gene clusters by exogenous small molecules. *FEMS microbiology reviews*, 41(1), 19–33. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw035>.
68. **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>.
69. **Oren A. (2010).** Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental technology*, 31(8-9), 825–834. <https://doi.org/10.1080/09593330903370026>.
70. **Oren, A. (2006).** Life at High Salt Concentrations. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. 2:263-282. [https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7\\_9](https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_9).
71. **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
72. **Phillips, K., Zaidan, F., Elizondo, O. R., & Lowe, K. L. (2012).** Phenotypic characterization and 16S rDNA identification of culturable non-obligate halophilic



## *Références bibliographiques*

- bacterial communities from a hypersaline lake, La Sal del Rey, in extreme South Texas (USA). *Aquatic biosystems*, 8(1), 5. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-5>.
73. **Public Health England.** (2014). Oxidase Test. UK Standards for Microbiology Investigations. 26 Issue 2.3.
74. **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>.
75. **Reang, L., Bhatt, S., Tomar, R. S., Joshi, K., Padhiyar, S., Vyas, U. M., & Kheni, J. K.** (2022). Plant growth promoting characteristics of halophilic and halotolerant bacteria isolated from coastal regions of Saurashtra Gujarat. *Scientific reports*, 12(1), 4699. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08151-x>.
76. **Richards, L. A.** (1954). Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. *US Salinity Lab., US Department of Agriculture Handbook 60* California, USA.
77. **Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., Quesada, E., & Ruiz-Berraquero, F.**, (1982). Some physiological features of a *Halococcus* sp. at low salt concentrations, *FEMS Microbiology Letters*, 15 (4): 249–252, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1982.tb00227.x>.
78. **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>.
79. **Saini, R. K., & Keum, Y. S.** (2017). Progress in Microbial Carotenoids Production. *Indian journal of microbiology*, 57(1), 129–130. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0637-x>.
80. **Serino, I., Squillaci, G., Errichiello, S., Carbone, V., Baraldi, L., La Cara, F., & Morana, A.** (2023). Antioxidant Capacity of Carotenoid Extracts from the *Haloarchaeon Halorhabdus utahensis*. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 12(10), 1840. <https://doi.org/10.3390/antiox12101840>
81. **Shivanand, P., & Mugeraya, G.** (2011). Halophilic bacteria and their compatible solutes— osmoregulation and potential applications. *Current Science*, 100 (10), 1516–1521.

## *Références bibliographiques*

82. **Singh, R. P., & Jha, P. N. (2016).** A Halotolerant Bacterium *Bacillus licheniformis* HSW-16 Augments Induced Systemic Tolerance to Salt Stress in Wheat Plant (*Triticum aestivum*). *Frontiers in plant science*, 7, 1890. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01890>.
83. **Soil Survey Staff (2010).** Keys to Soil Taxonomy, 11th ed. USDA-Natural Resources Conservation Service, Washington, DC.
84. **Sun, Y., Liu, W. C., Shi, X., Zheng, H. Z., Zheng, Z. H., Lu, X. H., Xing, Y., Ji, K., Liu, M., & Dong, Y. S. (2021).** Inducing secondary metabolite production of *Aspergillus sydowii* through microbial co-culture with *Bacillus subtilis*. *Microbial cell factories*, 20(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01527-0>.
85. **Tommonaro, G., Abbamondi, G. R., Iodice, C., Tait, K., & De Rosa, S. (2012).** Diketopiperazines produced by the halophilic archaeon, *Haloterrigena hispanica*, activate AHL bioreporters. *Microbial ecology*, 63(3), 490–495. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9980-y>.
86. **Vera-Gargallo, B., Chowdhury, T. R., Brown, J., Fansler, S. J., Durán-Viseras, A., Sánchez-Porro, C., Bailey, V. L., Jansson, J. K., & Ventosa, A. (2019).** Spatial distribution of prokaryotic communities in hypersaline soils. *Scientific reports*, 9 (1), 1769. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38339-z>.
87. **WRB. (2007).** World Reference Base for Soil Resources 2006, first update. *World Soil Resources Reports* N°103. FAO, Rome.
88. **Wu, Q., Ni, M., Dou, K., Tang, J., Ren, J., Yu, C., & Chen, J. (2018).** Co-culture of *Bacillus amyloliquefaciens* ACCC11060 and *Trichoderma asperellum* GDFS1009 enhanced pathogen-inhibition and amino acid yield. *Microbial cell factories*, 17(1), 155. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1004-x>.
89. **Yadav, A. N., & Saxena, A. K. (2018).** Biodiversity and biotechnological applications of halophilic microbes for sustainable agriculture. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 6 (1), 48-55.



# **Annexes**

## ➤ Annexe 1

## Composition des milieux de culture et solutions

**Gélose nutritif (pH = 6,8 a 7,4)**

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

**Gélose Mueller- Hinton (pH = 7,4)**

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

**Gélose Sabouraud (pH = 7)**

Glucose	40 g
Peptone	10 g
Agar	15
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	05g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml

**Eau physiologique**

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

## ➤ Annexe 2

Catalogue analytique de plaque API® 20<sup>E</sup>

Tests	Composants actifs	Réactions-enzymes	résultats	
			négatif	positif
ONPG	2-nitrophényl- βDgalactopyranoside	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl- βDGalactopyranosidase)	Incolore	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine DiHydrolase	Jaune	Rouge-orange
LDC	L-lysine	Lysine DéCarboxylase	Jaune	Rouge-orange
ODC	L-ornithine	Ornithine DéCarboxylase	Jaune	Rouge -orange
CIT	trisodium citrate	utilisation du CITrate	Vert pale-jaune	Bleu-vert-bleu
H2S	sodium thiosulfate	production d'H2S	Incolore-grisatre	Depot noir-fin lisere
URE	Urée	UREase	Jaune	Rouge -orange
TDA	L-tryptophane	Tryptophane DésAminase	TDA-immédiat Jaune Marron-rougeâtre	
IND	L-tryptophane	production d'INDole	JAMES-immédiat Incolore-vert pale-jaune rose	
VP	sodium pyruvate	production d'acétoïne	VP1+VP2/ 10 min Incolore-rose pale rose-rouge	
GEL	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase (GELatine)	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	fermentation - oxydation (GLUcose)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
MAN	D-mannitol	fermentation – oxydation (MANnitrol)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
INO	Inositol	fermentation – oxydation (INOsitol)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
SOR	D-sorbitol	fermentation – oxydation (SORbitol)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
RHA	L-rhamnose	fermentation – oxydation (RHAmnose)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
SAC	D-saccharose	fermentation – oxydation (SACcharose)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
MEL	D-melibiose	fermentation – oxydation (MELibiose)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
AMY	Amygdaline	fermentation – oxydation (AMYgdaline)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
ARA	L-arabinose	fermentation – oxydation (ARAbinose)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris

## 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	jaune-vert	bleu-violet
1.2	LDC	L-lysine	0,76	Lysine DeCarboxylase	jaune / jaune-orange	rose-violet
1.3	URE	urée	0,44	UREase	jaune / jaune-orange	rose-violet
1.4	LARL	L-arabitol	0,56	L-ARabitoL (Acidification)	bleu / bleu-vert	jaune / vert-jaune
1.5	GAT	acide galacturonique	0,56	GALacturonaTe (Acidification)		
1.6	5KG	potassium 5-cétogluconate	0,82	5 KetoGluconate (Acidification)		
1.7	LIP	5-bromo-3-indoxyl-nonanoate	0,035	LIPase	incolore	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	incolore	jaune
1.A	MAN	D-mannitol	0,56	MANnitol (Acidification)	bleu / bleu-vert	jaune / vert-jaune
1.B	MAL	D-maltose	0,56	MALtose (Acidification)		
1.C	ADO	adonitol	0,56	ADONitol (Acidification)		
1.D	PLE	palatinose	0,56	PaLatiNoSe (Acidification)		
1.E	βGUR	4-nitrophényl-βD-glucuronide	0,03	βGLUCURonidase	incolore	jaune
1.F	MNT	sodium malonate	0,184	MalCoNaTe	jaune / vert pâle	bleu-vert / bleu
0.0	IND	L-tryptophane	0,077	INDole (Production)	JAMES / immédiat (*) incolore / jaune / beige	
0.1	βNAG	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl-βD-glucosaminide	0,045	N-Acétyl-β-Glucosaminidase	incolore	bleu
0.2	βGAL	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,03	βGALactosidase	incolore	jaune
0.3	GLU	D-glucose	0,56	GLUCose (Acidification)	bleu / bleu-vert	jaune / vert-jaune
0.4	SAC	D-saccharose	0,56	SACcharose (Acidification)		
0.5	LARA	L-arabinose	0,56	L-ARAbinose (Acidification)		
0.6	DARL	D-arabitol	0,56	D-ARAbitoL (Acidification)		
0.7	αGLU	4-nitrophényl-αD-glucopyranoside	0,03	αGLUCosidase	incolore	jaune
0.8	αGAL	4-nitrophényl-αD-galactopyranoside	0,09	αGALactosidase	incolore	jaune
0.9	TRE	D-trehalose	0,56	TREhalose (Acidification)	bleu / bleu-vert	jaune / vert-jaune
0.A	RHA	L-rhamnose	0,56	RHAminose (Acidification)		
0.B	INO	inositol	0,56	INOsitol (Acidification)		
0.C	CEL	D-cellobiose	0,56	CELlobiose (Acidification)		
0.D	SOR	D-sorbitol	0,56	SORbitol (Acidification)	incolore / jaune très pâle	jaune
0.E	αMAL	4-nitrophényl-αD-maltopyranoside	0,092	αMALtosidase		
0.F	AspA	acide L-aspartique 4-nitroanilide	0,058	acide L-Aspartique Arylamidase	incolore / jaune très pâle	jaune

مع عودة ظهور مقاومة المضادات الحيوية، يظل البحث عن مركبات جديدة أو بديلة مضادة للميكروبات أولوية. تمثل النظم البيئية المتطرفة، بما في ذلك الأوساط المالحة، مصدرًا واعدًا لعزل الكائنات الحية الدقيقة القادرة على إنتاج مركبات طبيعية عالية الإمكانيات يمكنها معالجة تحديات مقاومة مضادات الميكروبات الحالية.

الهدف من عملنا هو فحص الأنشطة المضادة للميكروبات من البكتيريا المتطرفة المعزولة في سبخة وهران. لهذا، تم إجراء فحص أولي لأنشطتهم المضادة للميكروبات. وبدأ إنتاج هذه الأنشطة في الوسط المتوسط والسائل. تم البحث عن الأنشطة المثبطة من خلال تقنية أسطوانات الأغار للمزارع على وسط أغار وتقنية الأبار للجراثيم الفائقة فيما يتعلق بالجراثيم المرجعية (البكتيريا الإيجابية والغرام السلبية والخمائر). أظهر الفحص الأولي أن الإنتاج على الوسط الصلب هو الأكثر فعالية و ابرز أن العزلة LMB3S01 هي الأكثر نشاطًا. تم استخراج أنشطتها المضادة للميكروبات من زراعتها على الوسط الصلب. تم استخدام ثلاثة مذيبيات من مختلف الاستقطابات: الكلوروفورم وأسيتات الإيثيل والميثانول. أظهرت المستخلصات الثلاثة التي تم الحصول عليها تأثيرًا مثبطًا ضد الجراثيم التي تم اختبارها سابقًا ولكن بتأثير أضعف من الذي تم الحصول عليه عن طريق الفحص الأولي. تم اختيار LMB3S01 المعزولة أيضًا للتوصيف الظاهري، وهي عصيات إيجابية الجرام، هوائية، تمتلك الكاتالاز والأوكسيدياز. كشف تقييم نموها في ظروف مختلفة من الملوحة ودرجة الحرارة والأس الهيدروجيني أنها معزولة شديدة التحمل للملوحة الحرارة والأوساط القلوية. كشف توصيفها الكيميائي الحيوي من خلال أنظمة ID32 AP 20<sup>E</sup> عن قوة أيضية مثيرة للاهتمام. كشفت دراسة لمقاومتها المضادات الحيوية عن حساسيتها تجاه Kanamycin و Tobramycin و مقاومتها Fosfomycin و Vancomycin و Amoxicillin

الكلمات الرئيسية: بكتيريا البيئات القاسية، الأنشطة المضادة للميكروبات، الأوساط المالحة

## Résumé

Avec la réémergence de résistance aux antibiotiques, La recherche de composés antimicrobiens nouveaux ou alternatifs demeure une priorité. Les écosystèmes extrêmes, notamment les habitats salins, représentent une source prometteuse pour l'isolement de microorganismes capables de produire des composés naturels à fort potentiel qui peuvent faire face aux défis actuels de résistance aux antimicrobiens.

L'objectif de notre travail est de réaliser un criblage des activités antimicrobiennes à partir des bactéries extrémophiles isolées de la grande sebkha d'Oran. Pour cela, un screening primaire de leurs activités antimicrobiennes a été effectué. La production des activités a été lancée sur milieu gélosé et sur milieu liquide. La recherche des activités inhibitrices a été effectuée par la technique des cylindres d'agar pour les cultures sur milieu gélosé et la technique des puits pour les surnagants vis-à-vis des germes de références (Bactéries à Gram positif et à Gram négatif, et des levures). Le screening primaire a montré que la production sur milieu solide est la plus rentable et a fait ressortir l'isolat LMB3S01 comme l'isolat le plus prometteur, ses activités antimicrobiennes ont été extraites à partir de sa culture sur milieu solide. Trois solvants de différentes polarités ont été utilisés : chloroforme, acétate d'éthyle et méthanol. Les trois extraits obtenus ont démontré un effet inhibiteurs vis-à-vis les germes précédemment testés mais avec des diamètres moins importants que ceux obtenus par le screening primaire. L'isolat LMB3S01 a été également retenu pour faire l'objet d'une caractérisation phénotypique, c'est un bâtonnet à Gram positif mobile, aérobic stricte, possédant la catalase et l'oxydase. L'évaluation de sa croissance à différentes conditions de salinité, de température et de pH a révélé qu'il s'agit d'un isolat halotolérant extrême, thermotolérant et alcalotolérant. Sa caractérisation biochimique par les systèmes API 20E et ID32 a fait apparaitre un pouvoir métabolique intéressant. L'étude de son profil de résistance aux antibiotiques a révélé une sensibilité à la Kanamycine et Tobramycine et une résistance à la Fosfomycine, Vancomycine et Amoxicilline

**Mots clés :** microorganismes extrémophiles, activités antimicrobienne, habitats salins.

## Abstract

With the re-emergence of antibiotic resistance, the search for new or alternative antimicrobial compounds remains a priority. Extreme ecosystems, including saline habitats, represent a promising source for the isolation of microorganisms able to produce high-potential natural compounds that can address current antimicrobial resistance challenges.

The objective of our work is to screen antimicrobial activities from the isolated extremophile bacteria of the great sebkha of Oran. For this, a primary screening of their antimicrobial activities was carried out. The production of the activities was searched on agar medium and liquid medium. The search for inhibitory activities was carried out by the technique of plug agar for cultures on agar medium and the technique of wells for supernatants against reference germs (Gram positive and Gram negative bacteria, and yeasts). Primary screening showed that solid medium production is the most effective and highlighted isolate LMB3S01 as the most promising isolate; its antimicrobial activities were extracted from its solid medium culture. Three solvents of different polarities were used: chloroform, ethyl acetate and methanol. The three obtained extract demonstrated an inhibitory effect against the tested germs but with smaller diameters than those obtained by primary screening. Isolate LMB3S01 was also selected for phenotypic characterization; it is an aerobic, motile, Gram positive rod-shaped bacterium, possessing catalase and oxidase. The evaluation of its growth at different salinity, temperature and pH conditions revealed that it is an extreme halotolerant, thermotolerant and alkalotolerant isolate. Its biochemical characterization by the API 20E and ID32 systems revealed an interesting metabolic power. The study of its antibiotic resistance profile revealed sensitivity to Kanamycin and Tobramycin and resistance to Fosfomycin, Vancomycin and Amoxicillin

**Keywords:** extremophilic microorganisms, antimicrobial activities, saline habitats