

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université 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 pour l'obtention du diplôme de

Magister en Microbiologie appliquée

Option : Maitrise de la Qualité Microbiologique et du Développement Microbien

Présenté par

M^{elle} : AISSAOUI Nadia

*Étude de molécules d'antibiotiques biosynthétisées par une bactérie extrémophile
issue d'une sebkha Algérienne d'EL Goléa*

Devant le jury

Président :	M ^r . Moussa Boudjamaa B.	Professeur .Université de Tlemcen.
Directrice :	M ^{me} Khelil N.	Maître de conférences .Université de Tlemcen.
Examineurs :	M ^r Abdelouahid D.E.	Professeur .Université de Tlemcen.
	M ^{me} Hassaine H.	Maître de conférences .Université de Tlemcen.

Année universitaire : 2012-2013

Remerciements

Le présent travail a été effectué au sein du **Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-Alimentaire au Biomédical et à l'Environnement** de l'université de Tlemcen, en collaboration avec : IRD de Marseille –France –, le laboratoire des produits naturels- université de Tlemcen -et le laboratoire de chimie et synthèse des composés organiques- université de Tlemcen-.

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de Thèse **Dr Khelil N.**, de m'avoir donnée l'opportunité de faire un sujet passionnant, de m'avoir permise de découvrir le monde « **des Extrêmophiles** », de m'avoir fait confiance tout au long de ce travail et de m'avoir toujours encouragée dans les travaux, notamment durant la correction de ce manuscrit. Merci pour votre gentillesse, votre patience, de votre générosité et de votre disponibilité. J'ai eu vraiment un grand honneur de travailler sous votre direction.

Mes vifs remerciements s'adressent au **Pr Moussa Boudjamaa B.**, le directeur du laboratoire **LAMMABE**, de me faire l'honneur d'accepter de présider le jury.

Je remercie M^r **Abdelouahid D.E.**, professeur à l'Université de Tlemcen, pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance au **Dr Hassaine H.**, maître de conférences classe A à l'université de Tlemcen, pour m'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je profite aussi de ces pages pour adresser mes plus vifs et sincères remerciements à : **M^r Jean Luc Cayol (IRD de Marseille), M^r Moussaoui A., M^r Baghdad C., M^r Mostapha-Kara B., M^r Rebiahi S.A., et à M^{me} Boucherit Z.**, pour leur aide et pour tous les conseils.

La liste est longue mais il me tient particulièrement à cœur de remercier toutes les personnes qui m'ont consacré une partie de leur temps et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...?

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour,

Le respect, la reconnaissance...?

Ainsi, c'est tout simplement que

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents, les prunelles de mes yeux,

*A ma mère AICHA qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau
.Ni sacrifices, ni privatisations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de
l'avenir de ces enfants.*

*A mon cher papa ABDELKADER qui a su se montrer patient, compréhensif et
encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.*

Veillez trouver ici, le témoignage de mon amour éternel.

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

*A ma sœur NAWAL et mon frère MOHAMMED que dieu vous garde et vous protège que
votre chemin soit plein succès.*

A toute ma famille

*A mes chéries Téma, Dounia, Zohra, Asma, Amira, Chafika, Fatima, Nadjet, Samia,
Nassima, Khadidja, Soumia, siham et Témoucha pour leur aide et leur soutien que dieu
vous protège et vous préserve*

*A toute l'équipe de LAMAABE en particulier l'équipe des EXTREMOPHILES et à toutes
les personnes qui m'ont aidée à réaliser ce travail.*

Nadia

Tables des matières

	Pages
Résumé.....	
Abstract.....	
الملخص	
Liste des abréviations et signes utilisés	
Liste des annexes	
Listes des figures.....	
Liste des tableaux	
<i>Introduction générale</i>	01
<i>Revue bibliographique</i>	04
1-Les extrêmophiles.....	04
1.1-Terminologie et définitions.....	04
1.2-Diversité des milieux extrêmes	06
<i>1.2.1-Les environnements à hautes température</i>	06
<i>1.2.2-Les milieux à pH alcalin</i>	07
<i>1.2.3-Les milieux à pH acide</i>	08
2- Les bactéries halophiles : définition et classification	09
3- Les <i>Bacillus</i> halophiles et halotolérants	12
3.1-Taxonomie du genre <i>Bacillus</i>	12
3.2-Les <i>Bacillus</i> halophiles et halotolérants	14
3.3-Niche écologique des <i>Bacillus</i> halophiles et halotolérants.....	14
4-Stratégies utilisées pour l'osmoadaptation	18
4.1- Biosynthèse et/ou l'accumulation de solutés compatibles	18

5- Intérêts biotechnologiques des <i>Bacillus</i> halophiles et halotolérants	21
5.1- Enzymes	21
<i>5.1.1- Les protéases</i>	22
<i>5.1.2- Les lipases</i>	22
<i>5.1.3- Les cellulases</i>	23
<i>5.1.4- Autres enzymes</i>	23
5.2- Production des composés antimicrobiens	24
<i>5.2.1- Production des antibiotiques</i>	24
<i>5.2.2- La lutte biologique</i>	25
5.3- Fermentation des aliments	26
5.4- Production d'autres composés	27
<i>Matériel et méthodes</i>	28
I – Identification phénotypique et génotypique de la souche nommée ML9831	28
I.1- Origine de la souche	28
I.2- Description du site d'EL Goléa	28
I.3- Revivification et purification de la souche	30
I.4- Identification phénotypique de l'isolat	30
I.4.1- Caractérisation morphologique de la souche	30
<i>I.4.1.1- Aspect microscopique</i>	30

	Pages
<i>I.4.1.2- Aspect macroscopique</i>	31
I.4.2- Caractérisation physiologique	31
<i>I.4.2.1- Influence de la concentration en NaCl</i>	31
<i>I.4.2.2 -Effet du pH</i>	31
<i>I.4.2.3- Température optimale de croissance</i>	32
I.4.3- Caractérisation biochimique	32
<i>I.4.3.1- Mise en évidence des enzymes respiratoires</i>	32
<i>I.4.3.1.1- Recherche de la catalase</i>	32
<i>I.4.3.1.2- Recherche de la cytochrome-oxydase</i>	32
<i>I.4.3.1.3- Type respiratoire</i>	32
<i>I.4.3.1.4- Réduction du nitrate</i>	33
<i>I.4.3.2- Mannitol mobilité</i>	33
<i>I.4.3.3- Plaque API 20E</i>	34
<i>I.4.3.4- Hydrolyse de l'esculine</i>	34
<i>I.4.3.5- Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires</i>	35
<i>I.4.3.5.1- Test de la DNase</i>	35
<i>I.4.3.5.2- Détermination de l'activité amylolytique</i>	35
<i>I.4.3.5.3 -Détermination de l'activité protéolytique : recherche de la caséinase</i>	35
<i>I.4.3.5.4- Détermination de l'activité lipolytique</i>	36
➤ Hydrolyse du Tween 80	36
➤ Test de la lécithinase	36

	Pages
I.4.4- Sensibilité aux antibiotiques	36
I.5- Identification géotypique : étude phylogénique de la souche ML9831	37
I.5.1-Extraction et purification de l'ADN génomique	37
I.5.2-Réaction de polymérisation en chaine (PCR) et purification du fragment amplifié	38
I.5.3-Séquençage et analyse	38
II-Pré-caractérisation des activités antimicrobiennes produites par la ML9831	39
II.1- Recherche de l'activité antibactérienne	40
II.1.1- Technique des cylindres d'agar et choix du milieu optimal pour les activités antimicrobiennes	40
II.1.2-Concentration et extraction des activités antimicrobiennes	41
<i>II.1.2.1- Culture de l'isolat bactérien en milieu solide et choix du solvant</i>	<i>41</i>
<i>II.1.2.2-Culture de l'isolat bactérien en milieu liquide</i>	<i>41</i>
<i>II.1.2.2.1-Préparation du surnageant de la ML9831</i>	<i>41</i>
<i>II.1.2.2.2-Préparation de l'extrait concentré de la ML9831</i>	<i>42</i>
II.2- Recherche de l'activité antifongique contre la levure et les moisissures	42
II.3-Essais de séparation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes produites par la ML9831	44
II.3.1-Chromatographie sur couche mince en gel de silice	44
II.3.2- Révélation chimiques des chromatogrammes	44
II.3.3- Etude spectroscopique de l'extrait chloroformique : absorption infra-rouge	45

	Pages
<i>Résultats et discussion</i>	46
I- Résultats de l'identification phénotypique et génotypique de la souche nommée ML9831	46
I.1- Résultats de l'identification phénotypique de l'isolat	46
I.1.1- Caractérisation morphologique de la souche	46
<i>I.1.1.1-Aspect microscopique</i>	46
<i>I.1.1.2-Aspect macroscopique</i>	46
I.1.2- Caractérisation physiologique	48
<i>I.1.2.1- Influence de la concentration en NaCl</i>	48
<i>I.1.2.2- Effet du pH</i>	48
<i>I.1.2.3- Température optimale de croissance</i>	49
I.1.3- Caractérisation biochimique	50
<i>I.1.3.1-Mise en évidence des enzymes respiratoires</i>	50
<i>I.1.3.2-Plaqué API 20E</i>	52
<i>I.1.3.3-Dégradation de l'esculine</i>	53
<i>I.1.3.4-Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires</i>	53
I.1.4- Sensibilité aux antibiotiques	55
I.2-Résultats de l'identification génotypique de la ML9831 : <i>Phylogénie de la souche</i>	56
I.3- Discussion	58

	Pages
II-Résultats de la pré-caractérisation des activités antimicrobiennes produites par la ML9831	66
II.1- Recherche de l'activité antibactérienne	66
II.1.1- Résultats de la technique des cylindres d'agar et choix du milieu optimal pour les activités antimicrobiennes	67
II.1.2-Résultats de la concentration et extraction des activités antimicrobiennes	71
<i>II.1.2.1- Résultats de la culture de l'isolat bactérien ML9831 en milieu solide et choix du solvant</i>	71
<i>II.1.3.2- Résultats de la culture de l'isolat bactérien ML9831 en milieu liquide</i>	72
II.2- Recherche de l'activité antifongique	77
II.3-Résultats de l'essai de séparation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes produites par la ML9831	78
II.3.1-Chromatographie sur couche mince en gel de silice	78
II.3.2- Révélations chimiques des chromatogrammes	79
II.3.3- Etude spectroscopique de l'extrait chloroformique : absorption infra-rouge	81
II.4- Discussion	83
III-Discussion générale	89
<i>Conclusion</i>	94
<i>Références bibliographiques</i>	97
<i>Annexes</i>	122

Résumé

Les lacs hypersalins constituent un exemple typique d'environnements extrême abritant des microorganismes résistants aux fortes salinités leurs conférant ainsi des caractéristiques étonnantes révélant un véritable atout biotechnologique. Notre travail rentre dans cette optique peu exploitée en Algérie, et peut être divisé en deux parties : la première partie concernait à faire des approches culturales en combinaison avec des méthodes moléculaires qui consistait en un séquençage de l'ARNr16S, afin de positionner une souche bactérienne nommée **ML9831** isolée à partir d'un lac hyepsalin et pollué : le lac d'EL Goléa.

La seconde consistait à mettre en évidence les activités antimicrobiennes par cet isolat, par différentes techniques de screening primaire et secondaire tout en choisissant le meilleur milieu de production et le meilleur solvant d'extraction. Un début de caractérisation de ces activités a été entamé en utilisant la chromatographie sur couche mince en gel de silice et une analyse par l'infra-rouge.

Les résultats des analyses phylogéniques ont conduit à considérer l'isolat **ML9831** comme un nouveau taxon au sein de la famille des *Bacillaceae* (avec 96% de similitude). La souche est proche de *Filobacillus milosensis* et de *Bacillus haloalkaliphilum* avec **95%** de similitude. L'étude phénotypique a montré des différences entre la **ML9831** et les deux souches qui lui sont proches et n'a fait que confirmer les résultats du séquençage de l'ARNr 16S.

Le screening primaire a révélé que la souche **ML9831** est active contre les bactéries à Gram positif et seulement contre *Pseudomonas aeruginosa* pour les bactéries à Gram négatif et aucun pouvoir n'a été décelé contre *Candida albicans*. Le screening secondaire nous a permis de choisir le chloroforme comme le meilleur solvant d'extraction à partir du bouillon nutritif. L'extrait chloroformique a montré une activité envers les souches bactériennes testées, contre *Cladosporium spp.* et un léger pouvoir inhibiteur contre *C.albicans*. La technique de la chromatographie sur couche mince en gel de silice a révélé la présence d'une seule molécule et la révélation chimique nous a indiqué la présence des composés phénoliques et peptidiques. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse spectrale infra-rouge.

Mots clés : Nouveau taxon, *Bacillus*, sebkha, extrémophile, halotolérante, molécules antimicrobiennes.

Abstract

Hypersaline lakes are a typical example of extreme environments, which shelter halophilic microorganisms adapted to resist in high salinity confers them surprising characteristics, what reveals a real biotechnological trump. Our work falls into that untapped optical in Algeria, and can be divided into two parts: the first related to cultural approaches in conjunction with molecular methods which consisted of a 16S rRNA sequencing to position a bacterial strain named **ML9831** isolated from a polluted and hyepsalin lake El Golea.

The second was to highlight the antimicrobial activities by this isolate, by various techniques of primary and secondary screening while choosing the best production media and the best solvent of extraction. A beginning of characterization of these activities was initiated using thin layer chromatography on silica gel and analyzed by infrared.

The results of phylogenetic analyzes have led that the isolate named **ML9831** is a new taxon in the family of *Bacillaceae* (with **96%** similarity). The strain is close to *Filobacillus milosensis* and *Bacillus haloalkaliphilum* with **95%** similarity. The phenotypic study showed differences between the ML9831 and two strains that are near and has only confirmed the results of 16S rRNA sequencing.

The primary screening showed that the strain **ML9831** has an antimicrobial effect against Gram-positive and only against *Pseudomonas aeruginosa* for Gram negative and no power was detected against *Candida albicans*. The secondary screening allowed us to choose the chloroform as the best extraction solvent from the nutrient broth. The chloroform extract showed activity against the bacterial strains tested, against *Cladosporium spp.* and a slight inhibitory effect against *C. albicans*. The technique of thin-layer chromatography silica gel revealed the presence of one molecule and the chemical revelation we indicated the presence of phenolic and peptidic compounds. These results were confirmed by infrared spectral analysis.

Key words: New taxa , *Bacillus*, sabkha, extremophilc, halotolerant, antimicrobial molecules.

الملخص

البحيرات العلية الملوحة هي مثال نموذجي لإبواء الكائنات المهجرية المقاومة للملوحة و التي تعطى خصائصها المدهشة و تكشف عن قدراتها في ميدان التكنولوجيا الحيوية. عملنا هذا يدخل في هذه المنهجية القليلة الاستغلال في الجزائر و يمكننا أن نقسمه إلى قسمين

القسم الأول يتمثل في دمج الدراسة الفينوتبية مع التحليل الفيلوجيني المتمثل في تحليل ARNr16 من اجل معرفة مكان الخلية البكتيرية **ML9831** الآتية من بحيرة مالحة و ملوثة و هي بحيرة EL Goléa

القسم الثاني يتمثل في تسليط الضوء على إنتاج المركبات المضادة للميكروبات من هذه البكتيريا عن طريق عدة تقنيات مع تحديد أفضل بيئة الإنتاج واستخلاص أفضل المذيبات و اختبارها ضد البكتيريا والفطريات. كما تمت بداية تحديد نوعية هذه المركبات عن طريق تقنية الفصل الكروماتوگرافي و التحليل بواسطة الأشعة ما تحت الحمراء.

فقد بينت النتائج أن **ML9831** هي بكتيريا جديدة تنبع إلى عائلة *Bacillaceae* بنسبة 96% و هي قريبة من الخلية البكتيرية *Filobacillus milosensis* و الخلية *Bacillus haloalkalinophilum* بنسبة 95% . الدراسة الفينوتبية أثبتت أن **ML9831** تختلف عن سابقتها في عدة خصائص مما أكدت نتائج تحليل ARNr16 .

النتائج الأولية لدراسة نتاج المركبات المضادة للميكروبات أثبتت أن لها تأثير مضادات الميكروبات ضد إيجابية الجرام و ضد *P. aeruginosa* كبكتيريا السلبية الغرام و لم يتم الكشف عن أية تأثير ضد *Candida albicans* .

و تم الكشف بواسطة بطارية من المذيبات العضوية المختلفة القطبية من اختيار مستخلص الكلوروفورم كأفضل مذيب لاستخلاص الجزيئات المضادة للجراثيم التي تنتجها هذه السلالة من Bouillon nutritif . وأظهر مستخلص الكلوروفورم نشاط معاد للسلالات البكتيرية المختبرة و كذا ضد *Cladosporium spp* وتأثير طفيف ضد

Candida albicans

كما كشفت تقنية الفصل الكروماتوگرافي عن وجود مرب واحد ذو طبيعة فينولية و ببتيدية . هذه النتائج تم تأكيدها بواسطة التحليل عن طريق الأشعة ما تحت الحمراء.

الكلمات المفتاحية: سلالة جديدة , *Bacillus* , سبخة , غير عادية , المتحملة للملوحة , الجزيئات المضادة للميكروبات

Liste des abréviations et signes utilisés

- : Négatif.

% **p/v** : pourcentage poids-volume.

% **v/v** : pourcentage volume –volume.

% : pourcentage.

+ : Positif.

°C : température en degré Celsius .

ADH : Arginine-Dihydrolase.

ADN : Acide DésoxyriboNucléique.

AMY : Amygdaline.

API 20 E : Appareil et Procédés
d'Identification 20 entérobactéries.

ARA : arabinose.

ARNr 16S : Acide RiboNucléique
ribosomale 16S.

ATCC : American Type Culture
Collection.

ATP : Adénosine Tris Phosphate.

Ca²⁺ : ion calcium.

CaCO₃ : calcite

CaSO₄ 2H₂O : gypse.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CIT : citrate.

Cl⁻ : ion chlorure.

CLSI : Clinical and Laboratory Standard Institut.

cm : centimètre.

DNases : DésoxyriboNucléase .

EAE : extrait d'acétate d'éthyle.

EC : extrait chloroformique.

EE : extrait d'éther.

EM : extrait méthanolique.

EMBL : European Molecular Biology Laboratory.

ER : encours de réalisation.

FeCl₃ : Chlorure de fer.

g/l : Gramme par litre.

GEL : gélatine.

GLU : glucose.

H₂S : Sulfure d'Hydrogène.

HCL : chlorure d'hydrogène.

HCO₃ : hydrogénocarbonate.

I : intermédiaire.

IND : indole.

INO : inositol.

K⁺ : ion potassium.

KCl : chlorure de potassium.

KCl, MgCl₂ 6H₂O : carnallite.

LDC : Lysine decarboxylase.

M : Concentration molaire.

MAN : mannose.

MEL : melibiose.

Mg²⁺ : ion magnésium.

mg/ml : milligramme/millilitre.

min : minute.

ml : millilitre.

mm : millimètre.

mm/ an : millimètre/an.

MRSA : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline.

N : normalité.

n.d : Non Déterminé.

Na⁺ : ion sodium.

NaCl : chlorure de sodium.

NaOH : Hydroxyde de Sodium.

nm : nanomètre.

ODC : Ornithine decarboxylase .

ONPG : Ortho-nitrophényl- β -galactoside.

Ox : Oxydase.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

PDA : Ptatose Dextrose Agar.

R : résistante.

R_f : rapport frontal.

RHA : rhamnose.

S : sensible.

SAC : saccharose.

SO₄²⁻ : ion sulfate.

SOR : sorbitol.

TDA : L-tryptophane.

UFC /ml : Unité Format Colonie / millimètre.

URE : urée.

VP : Voges-Proskauer.

W : Une semaine.

μ l : microlitre.

Liste des annexes

Annexe 01 : Préparation des milieux de cultures utilisés et de quelques réactifs

Annexe 02 : Résumé des normes pour la description de nouveaux taxons de bactéries aérobies formant des endospores selon **Logan et al. (2009a)**.

Annexe 03 : Tableau de lecture API 20 E.

Annexe 04 : Tableau de lecture des zones critique d'inhibition selon **Bauer et al. (1966)**.

Annexe 05 : Préparation des révélateurs chimiques de la chromatographie sur couche mince.

Annexe 06 : Quelques propriétés physico-chimiques des solvants organiques utilisés dans le travail.

Annexe 07 : Tableau de corrélation dans le moyen infrarouge entre les groupes fonctionnels et les bandes d'absorption.

Annexe 08 : Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar (FDR).

Liste des figures

	Pages
Figure n° 1 : Arbre phylogénétique basée sur la séquence de la petite sous unité de l'ARNr 16 S. Les microorganismes halophiles et halotolérants sont branchés sur l'arbre par un trait gras (Oren, 2002).	11
Figure n° 2 : Photos des <i>plans thalassohalins</i> : Marais salants de Costa Blanca en Espagne (à droite) et à San Francisco au USA (à gauche) (Falb et al ., 2005).	15
Figure n° 3 : Photos des plans <i>athalassohalins</i> : à gauche : Le grand lac salé d'Utah au USA ; à droite : La mer Morte. (http://www.jmg.centerblog.net/rub)	17
Figure n °4 : Photos de la localisation du lac EL Goléa (Source : Google Earth mis à jour le 05/11/2011).	29
Figure n°5 : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). A droite : culture bactérienne âgée formant des spores ; à gauche : culture jeune révélant la couleur violette des Gram positifs. Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Cyber shot DSCW530 (Zoom x4).	47
Figure n°6 : Aspect macroscopique des colonies sur le milieu KN solide additionné de 10% de NaCl. Photo prise avec un appareil photo numérique Sony Ericsson Cyber-shot DSCW530 (zoom x1).	47
Figure n°7 : Cinétique de croissance de la ML9831 à plusieurs concentrations en NaCl.	48
Figure n°8 : Cinétique de croissance de la ML9831 à plusieurs pH.	49
Figure n°9 : Cinétique de croissance de la ML9831 à plusieurs températures.	50
Figure n ° 10 : Résultats de la mise en évidence des enzymes respiratoires et le test Mannitol- mobilité de la ML9831 . Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Cyber shot DSCW530 (Zoom x1).	51

Figure n°11 : Résultat de la plaque API 20 E de la ML9831 . Photo prise avec un appareil photo numérique Sony Cyber shot DSC-W530 (Zoom x1).	52
Figure n°12 : Résultat de l'hydrolyse de l'esculine par la ML9831 . Photo prise avec un appareil photo numérique Sony Cyber shot DSC-W530 (Zoom x1).	53
Figure n°13 : Profil des activités hydrolytiques détectées de la ML9831 : A : Hydrolyse de l'amidon ; B : Hydrolyse de la caséine ; C : Hydrolyse de la lécithine ; D : Hydrolyse du Tween 80 ; E : Hydrolyse de L'ADN.	54
Figure n°14 : Résultats de l'antibiogramme de la ML9831 . Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Cyber shot DSC-W530 (Zoom x1).	56
Figure n°15 : Position phylogénique de la souche ML9831 au sein de l'ordre des <i>Bacillales</i>	57
Figure n°16 : Exemples de screening primaire de l'activité antibactérienne de la ML9831 contre les bactéries à Gram positive par la technique des cylindres d'agar issus de la gélose nutritive : A : ML9831 contre <i>Bacillus cereus</i> ; B : ML9831 contre <i>Staphylococcus aureus</i> ; C : ML9831 contre <i>Listeria monocytogenes</i> . Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Ericsson Cyber-shot DSC (zoom x1).....	69
Figure n°17 : Exemples de screening primaire de l'activité antibactérienne de la ML9831 contre les bactéries à Gram négative par la technique des cylindres d'agar issus de la gélose nutritive : A : ML9831 contre <i>E. coli</i> ; B : ML9831 contre <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; C : ML9831 contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Ericsson Cyber-shot DSC (zoom x1)	70
Figure n°18 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique -issu du bouillon nutritif -de la ML9831 contre les bactéries à Gram positif .Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Ericsson Cyber-shot DSC (zoom x1).	74
Figure n°19 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique-issu du bouillon nutritif - de la ML9831 contre les bactéries à Gram négatif .Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Ericsson Cyber-shot DSC (zoom x1).	75

Figure n°20 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique -issu du bouillon nutritif -de la **ML9831** contre les bactéries test .Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Ericsson Cyber-shot DSC (zoom x1)..... **76**

Figure n°21 : Résultats de la chromatographie sur couche mince de gel de silice de l'extrait chloroformique de la **ML9831**. **A** : révélation à l'œil nu ; **B** : révélation avec le FeCl_3 ; **C** : révélation avec la ninhydrine. Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Ericsson Cyber-shot DSC (zoom x1)..... **80**

Figure n°22 : Spectre infra-rouge de l'extrait chloroformique déshydraté de la **ML9831** **82**

Liste des tableaux

Pages

Tableau n° 1 : Les principales caractéristiques des environnements extrêmes les plus étudiés (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995).....	06
Tableaux n° 2 : Différentes catégories des bactéries halophiles selon les définitions de Larsen (1962) et de Kushner (1993)	10
Tableaux n°3 : Différentes catégories des bactéries halotolérantes (Tiqula et al., 2006).....	10
Tableau n° 4 : Classification du genre <i>Bacillus</i> (Priest et al ., 1993).....	13
Tableau n° 5 : Quelques exemples de solutés compatibles (Roberts, 2005).	19
Tableau n°6 : Propriétés chimiques et physiques du lac d'El Goléa comparés avec ceux de l'Océan Atlantique (Boutaiba et al ., 2011).....	29
Tableau n° 7 : Disques d'antibiotiques utilisés et leur charge (μg)	37
Tableau n° 8 : Souches microbiennes test utilisées dans l'activité antimicrobienne ..	39
Tableau n° 9 : Résultats de la plaque API 20E de la ML9831	52
Tableau n° 10 : Résultat de l'antibiogramme de la ML9831	55
Tableau n° 11 : Caractéristiques différentielles entre la souche ML9831 et les deux autres espèces appartenant à l'ordre des <i>Bacillales</i>	60
Tableau n° 12 : Résultats de l'activité antibactérienne de la ML9831 par la technique des cylindres d'agar.....	68
Tableau n° 13 : Résultats de l'activité antibactérienne de la ML9831 en milieu solide et choix du solvant.....	71
Tableau n° 14 : Résultats de l'activité antibactérienne de la ML9831 en milieu liquide.....	73

Tableau n° 15 : Résultats de l'activité antifongique de la **ML9831**..... **78**

Tableau n° 16 : Résultats de la chromatographie sur couche mince de l'extrait chloroformique et des rapports frontaux des spots révélés. **79**

Introduction générale

Les microorganismes omniprésents dans notre environnement et dans quelques aliments que nous consommons, ne cessent d'occuper une place de plus en plus importante dans notre vie. La découverte à la fin des années 1930 que la vie pourrait exister dans des environnements aussi extrêmes que les sources thermales, la glace, sources hydrothermales sous-marines, et les marais salants a ouvert le monde scientifique à un tout nouveau groupe de microorganismes fascinants.

Les scientifiques ont été très intéressés à en apprendre d'avantage sur les caractéristiques et les processus de ces « *extrêmophiles* » qui leur permettent de vivre dans ces milieux hostiles.

Les habitats hypersalés formés depuis une longue période de l'histoire de la Terre sont caractérisés par une faible diversité microbienne qui dépend principalement de la salinité, de la solubilité de l'oxygène, de la composition ionique et, dans certains cas, de la température et du pH.

Ces dernières années, la recherche sur la biodiversité microbienne des environnements hypersalins s'est multipliée. En effet, les études visant une compréhension approfondie de ces environnements et des microorganismes appartenant à ces écosystèmes comme le Grand lac salé, Utah (USA), la Mer Morte et les marais salants de plusieurs pays comme le Lac Rose au Sénégal, les sebkhas au Nord de l'Afrique, ou encore les marais salants en Espagne etc , ont abouti à la découverte de nouveaux genres et espèces bactériennes (**D'Alessandro *et al.*, 2006**).

Cet intérêt croissant pour les microorganismes halophiles et halotolérants est dû au désir de connaître les limites possibles de la vie mais aussi d'élargir les connaissances dans le domaine de la vie dans ces milieux extrêmes, de la biodiversité et de la physiologie adaptative particulière de ces microorganismes. De nouveaux outils de screening en l'occurrence la biologie moléculaire a confirmé la présence de nouvelles souches bactériennes dans ces environnements, ayant un métabolisme plus complexe que les *Archaea*.

Outre l'aspect fondamental que présente ces nouvelles souches halophiles et halotolérantes, c'est leur pouvoir de produire des molécules d'intérêt biotechnologique qui constituent l'une des propriétés les plus prisées par les scientifiques. De récents développements prouvent clairement que les composants cellulaires des bactéries halophiles et halotolérantes sont uniques et fournissent une source valable de nouveaux composés comme les enzymes et les solutés compatibles. L'application de ces microorganismes dans la biodégradation des composés aromatiques et des hydrocarbures aromatiques polycycliques peut être envisagée.

Il en est de même pour la production de composés antimicrobiens. En effet, l'étude des bactéries halotolérantes et halophiles indigènes à ces milieux extrêmes peut aider à mieux exploiter cette importante source de molécules bioactives dans le domaine clinique surtout avec l'émergence de la multirésistance des bactéries pathogènes, l'apparition de nouvelles maladies et la réémergence d'anciennes ne sont finalement que des signes d'une impressionnante adaptation de ces bactéries pathogènes à notre environnement changeant et à nos moyens de défense. De plus ces composés peuvent être utilisés dans le domaine de l'agriculture notamment dans la lutte biologique mais aussi dans le domaine alimentaire.

Comme conséquence, l'intérêt pour l'isolement et la caractérisation des bactéries halotolérantes et halophiles et de leurs métabolites secondaires est de plus en plus accentué dans la perspective d'augmenter leurs applications industrielles.

L'Algérie est un pays riche par sa diversité écologique et géologique, il existe ainsi de nombreux écosystèmes hypersalins tels que les sebkhas, les sols désertiques. De nombreuses études ont été réalisées sur les actinomycètes halophiles comme celles de **Sabaou *et al.* (1980)** visant sur le dénombrement des actinomycètes de la rhizosphère et leur effet antagoniste vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* ou encore l'étude de **Khelil Klouche (1998)** sur les antibiotiques biosynthétisés par des bactéries filamenteuses extrêmophiles, notamment *Metallogenium sp.*

Malheureusement, les études existant sur les bactéries halophiles et halotolérantes notamment le genre *Bacillus* issues de ces milieux extrêmes restent encore inexploitées, malgré celles effectuées par **Hacène et al. (2004)** sur la diversité microbienne d'un lac salé situé à El Goléa, celle de **Kharroub (2007)** visant à l'identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila) ou encore celle de **Boutaiba et al. (2011)** visant à examiner et à comparer les propriétés physicochimiques et biologiques des lacs salés de Sidi Ameer et Himalatt situés dans le Sud du pays.

Notre étude s'inscrit dans cette optique et le principal objectif de ce travail était une caractérisation complète et un screening des activités antimicrobiennes biosynthétisées par une bactérie halotolérante nommée **ML9831** isolée à partir d'un milieu hypersalin qui est la sebkha d'El-Goléa (**Khelil Klouche ,1998**).

Cette étude a été réalisée au sein de l'équipe des « **Extrêmophiles** » du Laboratoire de Microbiologie Appliqué à l'Agro-Alimentaire au Biomédical et à l'Environnement sous la direction du **Dr Khelil N.** L'ensemble des travaux entrepris a été mené avec deux objectifs :

- ❖ Le premier portera sur l'identification phénotypique et génotypique de la souche nommée **ML9831** ;
- ❖ le deuxième chapitre sera consacré à la pré-caractérisation des activités antimicrobiennes actives produites par cette souche autant que bactérie issue d'un milieu extrême.

La première partie de ce travail est consacrée à la description des données bibliographiques relatives aux environnements hypersalins et aux bactéries halotolérantes et halophiles du genre *Bacillus* ainsi que les intérêts biotechnologiques. La deuxième partie, représente le travail pratique et qui indique les différentes techniques mises en œuvre afin de caractériser la souche isolée et de réaliser une pré-caractérisation sur les activités antimicrobiennes actives produites par cette souche. Les résultats obtenus avec ces différentes méthodes sont comparés et discutés dans la troisième partie. Enfin la dernière partie concernera la conclusion finale et soulignera les perspectives de ce travail.

Revue bibliographique

1- Les extrémophiles

1.1-Terminologie et définitions

La croissance et la survie des microorganismes sont commandées par une série de facteurs physiques et chimiques, tous les deux biotique et abiotique.

Pour pouvoir définir un environnement extrême, il faudrait d'abord définir ce qu'est un environnement non-extrême ou normal. Pour cela, un consensus général établit les facteurs physiques et chimiques les plus importants pour un environnement normal. Ces facteurs se situeraient approximativement à des valeurs de température de 4 à 50°C, de pH de 5 à 8,5 et de salinité entre celle de l'eau douce et celle de l'eau de mer (3,5%, p/v). Loin des environnements normaux, la diversité des espèces diminue et le stress environnemental augmente. Les facteurs de stress environnementaux sont habituellement additifs, l'augmentation d'un facteur, augmente la susceptibilité du microorganisme envers d'autres facteurs (**Kristjansson et Hreggvidsson, 1995**).

Un environnement est considéré comme extrême si ces facteurs physiques ou chimiques sont situés en dehors de la gamme des environnements qualifiés de normaux. Ces environnements extrêmes sont occupés par de nombreux groupes de microorganismes qui peuvent croître et se reproduire de façon optimale lorsqu'une ou plusieurs conditions de stress sont dans la plage de l'extrême (**Albers et al., 2001**).

Les microbiologistes utilisent le terme « *extrémophile* » pour décrire les microorganismes qui vivent dans des conditions extrêmes dans lesquelles d'autres formes de vie ne peuvent pas résister, tandis que **Wainwright (2003)** a proposé le terme « *extrémophile* » pour décrire les microorganismes qui peuvent survivre, mais ne croissent pas dans ces environnements.

Les premiers microorganismes extrémophiles isolés font partie des halophiles (du grec *halos*, sel), découverts dans un environnement qu'on croyait dépourvu de vie, d'où son nom : *la mer morte*. Ils vivent dans des concentrations en sels très élevées.

Les chercheurs ne se sont pas beaucoup intéressés à ces microorganismes, jusqu'à la découverte beaucoup plus tardive par **Woese et Fox (1977)** du 3^{ème} domaine du vivant, celui des *Archaea*, auxquels ils appartiennent.

En effet, ce groupe de procaryotes atypiques a la capacité à vivre dans les conditions extrêmes. La grande variabilité des *Archaea* leur permet de s'adapter à une grande diversité de niches écologiques. Des *Archaea* sont en effet présents dans les marais salants (**Baliga et al., 2004**), les zones arides et acides (**Futterer et al., 2004**) ou encore dans les lacs gelés de l'Antarctique (**De Long et al., 1994**). On les trouve aussi dans les environnements thermophiles et hyperthermophiles regroupant des espèces physiologiquement diverses telles que les *Methanoarchaea* productrices de méthane comportant 4 genres hydrogénotrophes et qui sont : *Methanococcus*, *Methanocaldococcus*, *Methanothermococcus* et *Methanotorris* (**Huber et al., 1982; Takai et al., 2004b**) , des chimioorganotrophes et des espèces sulfato-réducteurs c'est le cas des espèces du genre *Archaeoglobus* (**Henstra et al., 2007**).

Le terme extrêmophile est le plus souvent employé pour rapporter des microorganismes procaryotes, puisque la majorité appartient au domaine des *Archaea*. Les bactéries, elles aussi sont présentes dans ces milieux extrêmes. *Thermus aquaticus* fut la première bactérie extrêmophile isolée à partir des sources d'eau chaude du Parc national de Yellowstone aux Etats- Unis (**Brock, 1965**).

La découverte des ces microorganismes dans ces environnements particuliers a dès lors déclenché une sorte de chasse aux extrêmophiles. Après quelques années, cette chasse a abouti à la découverte d'une diversité inouïe, complètement inattendue, de microorganismes qui ne sont pas seulement contestés par un extrême, mais par plusieurs, et ils sont donc nommés « polyextrêmophiles » et qui ont été retrouvés dans des milieux supposés hostiles à la vie (**Mesbah et Wiegel, 2008**).

1.2-Diversité des milieux extrêmes

Il en existe différents groupes de milieux extrêmes. Tous sont répartis en fonction des paramètres physiques (pression, température...), ou chimiques (acidité, salinité...). Température, pH et salinité interagissent très fortement dans un biotope extrême. Au moins, sept principaux biotopes naturels peuvent être reconnus quand un de ces trois facteurs se trouve dans l'extrême de la gamme comme le montre le **tableau n° 1 (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995)**. Les habitats extrêmes les mieux étudiés sont ceux qui sont caractérisés par une forte température, pH élevé ou faible et une forte salinité.

Tableau n° 1 : Les principales caractéristiques des environnements extrêmes les plus étudiés.

(Kristjansson et Hreggvidsson, 1995)

Habitat	Température (°C)	pH	Salinité (% w/v)
Eau douce alcaline de sources chaudes	>60	>7	<6
Champs acides sulfatares.	>60	<3	<6
Les boues anaérobies et le sol géothermique	>60	5 à 7	<6
Zones acides riches en soufre et pyrite	<50	<3	<6
Milieux alcalins carbonatés	<50	>8	<6
Les lacs de sodes	<50	>9	>10
Les lacs hypersalins	<50	5 à 8	>10

1.2.1-Les environnements à hautes températures

La température est une variable importante dans chaque écosystème. La vie aux températures élevées est classée en forme thermophile ou hyperthermophile. Les thermophiles sont des microorganismes qui se développent à des températures relativement élevées, entre 45°C et 80°C. Les hyperthermophiles sont des thermophiles particulièrement extrêmes pour lesquelles les températures optimales sont au-dessus de 80°C (**Madigan et Martino, 2006**).

Les zones géothermiques les plus connues et bien étudiées sont en Amérique du Nord (Parc national de Yellowstone), l'Islande, la Nouvelle-Zélande, le Japon, l'Italie et l'ex-Union soviétique (**Lund et John, 2007**). Ces endroits sont généralement riches en produits chimiques réduits de l'intérieur de la Terre, et donc, de nombreuses bactéries thermophiles sont des chimiolithotrophes, réagissant avec l'hydrogène et le fer ferreux (**Amend et al ., 2003**). En conséquence, l'extraction de l'énergie par oxydation des composés de soufre produit de l'acide sulfurique, ce qui rend souvent les eaux géothermiques très acides.

De ce fait, de nombreuses bactéries hyperthermophiles sont également adaptées à l'acidité. En effet, les hyperthermophiles acidophiles extrêmes, avec un pH optimum de croissance égal ou inférieur à 3.0, produisent de l'acide sulfurique à partir de l'oxydation des minerais sulfurés. Une grande majorité des isolats thermophiles issus de ces eaux profondes sont des anaérobies chimiolithotrophes (**Satyanarayana et al ., 2005**).

La base moléculaire pour l'adaptation à ces environnements extrêmes a été étudiée de manière plus intensive pour les microorganismes vivant dans les milieux à hautes températures que pour tout autre paramètre. À des températures élevées, des biomolécules, telles que les enzymes se dénaturent et perdent leur fonction et, par conséquent, l'arrêt du métabolisme. En outre, la fluidité des membranes augmente de façon significative, ce qui perturbe la cellule.

Pour éviter la dénaturation et la dégradation, les thermophiles présentent une variété d'adaptations cellulaires. Leurs lipides membranaires contiennent des acides gras saturés et linéaires ce qui n'est pas le cas pour les mésophiles. Cela permet aux thermophiles de croître à des températures

plus élevées en fournissant le bon degré de fluidité nécessaire pour le fonctionnement des membranes (Ulrih *et al.*, 2009).

1.2.2-Les environnements à pH alcalin

Les alcalophiles sont des microorganismes qui se développent de façon optimale à pH supérieur à 9,0, souvent avec un pH optimum autour de 10.0, tout en montrant la croissance peu ou pas près des valeurs de pH neutres (Horikoshi, 1999). Une diversité de microorganismes peut croître à un pH de 10,5 (Martins *et al.*, 2001). Des communautés microbiennes vivent à un pH de 12,9 dans les lacs de soude de Maqarin, en Jordanie (Pedersen *et al.*, 2004). Les alcalophiles sont souvent isolés de milieux naturels qui ont également tendance à avoir des concentrations élevées en chlorure de sodium (NaCl) ; ceux-ci sont ainsi appelés haloalcalophiles (Gareeb et Setati, 2009).

Dans des conditions alcalines, les concentrations des ions d'hydrogène sont très faibles et les cellules ont des difficultés à utiliser l'ATP-synthase pour produire de l'énergie. Pour contourner ces problèmes, les microorganismes pompent ces ions et exportent d'autres afin de maintenir leur intérieur à proximité de la neutralité. En outre, la paroi cellulaire des alcalophiles agit comme une barrière de défense contre les conditions environnementales extrêmes (Horikoshi, 2006).

1.2.3-Les milieux à pH acide

Les environnements acides sont particulièrement intéressants car, en général, le faible pH de l'habitat est la conséquence du métabolisme microbien, et non pas une condition imposée par l'écosystème, comme c'est le cas pour d'autres environnements extrêmes. Les acidophiles sont des microorganismes qui se développent de façon optimale à un pH de 2,0 (Morozkina *et al.*, 2010).

Les acidophiles oxydent le soufre élémentaire (dans les zones volcaniques) ou les minéraux sulfurés (en drainage) pour obtenir de l'énergie, générant ainsi des milieux acides extrêmes (Rohwerder et Sand, 2007). En effet, la plupart des microorganismes caractérisés comme acidophiles strictes ont été isolés à partir des zones volcaniques ou de drainage minier acide.

Les environnements avec des conditions de pH bas sont un défi à la biochimie cellulaire car l'acidité extrême conduit à la dénaturation des protéines. Les acidophiles protègent leurs protéines en incluant les acides aminés neutres et par pompage active des protons hors de la cellule pour maintenir les niveaux de pH intracellulaire constants (**Baker-Austin et Dopson, 2007**).

2- Les bactéries halophiles : définition et classification

Les halophiles et les halotolérants présentent une grande diversité phylogénétique. On les trouve dans les trois domaines du vivant : *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya* (**Oren, 2002**).

Le domaine des *Bacteria* regroupe la plus grande diversité des bactéries halophiles et halotolérantes et forment un groupe phylogénétique très hétérogène beaucoup d'entre elles ont été examinées par **Ventosa et al. (1998)**.

Se sont des extrémophiles qui se développent dans des environnements ayant des concentrations très élevées en sel, elles sont capables d'équilibrer la pression osmotique du milieu et de résister à l'effet de la dénaturation provoqué par le sel (**Grant et al., 2001**).

De nombreuses définitions ont été données dans la littérature pour qualifier les termes halotolérant et halophile. La distinction entre les différents types a été faite en se basant sur les seuils de concentrations de sels requises ou tolérantes. Le terme « halophile » désigne les bactéries nécessitant la présence de sel (NaCl) dans le milieu pour leur croissance. En revanche, le terme « halotolérant » signifie que les bactéries tolèrent différentes concentrations en sel durant leur croissance. Les bactéries nécessitant moins de 1 % (p/v) de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérées comme halophiles.

Larsen (1962) proposa quatre groupes de bactéries halophiles, par contre **Kushner (1993)** proposa une classification de bactéries halophiles en fonction de leur réponse au NaCl, en se basant sur leur croissance maximale. Cinq groupes ont été définis mentionnés dans le **tableau n° 2**.

Les bactéries halotolérantes ont une croissance meilleure dans les milieux qui contiennent une concentration de sel <0.2 M (~1%) mais peuvent aussi tolérer des concentrations élevées en sel (**Yoon et al ., 2003**). Même au sein des halotolérantes, il y a différentes catégories selon la définition de **Tiqula et al. (2006)** comme le montre le **tableau n° 3**.

Tableaux n° 2 : Différentes catégories des bactéries halophiles selon les définitions de **Larsen (1962)** et de **Kushner (1993)**.

Classification de Larsen (1962)		Classification de Kushner (1993)	
Catégories	NaCl	Catégories	NaCl
Les non-halophiles	<2%	Les non-halophiles	~1%
Les halophiles légères	2 à5%	Les halophiles légères	1 à 3%
Les halophiles modérées	5 à 20%,	Les halophiles modérées	3 à 15%
Les halophiles extrêmes	20 à30%	Les halophiles à bord extrêmes	9 à 23%
		Les halophiles extrêmes	15 à 32%

Tableaux n° 3 : Différentes catégories des bactéries halotolérantes (**Tiqula et al., 2006**)

Catégories	NaCl
Légèrement halotolérantes	6 à 8%
Modérément halotolérantes	18 à 20 %
Les halotolérantes extrêmes	0 à 30%.

Les bactéries halophiles se développent sur une gamme étendue de concentration en sel de 3 à 15% de NaCl (p/v) et ci-dessus (**Litchfield ,2002**). La plupart d'entre elles sont des halophiles modérées ou halotolérantes plutôt qu'extrêmes et la diversité microbienne diminue avec l'augmentation de la salinité (**Oren ,2002**).

Historiquement, la taxonomie des bactéries halophiles et halotolérantes a été basée sur quelques caractéristiques phénotypiques avec peu d'attention accordée soit à la biochimie ou à la phylogénie (**Vreeland ,1993**).

Une fois les techniques de la biologie moléculaire ont été développées, de nouvelles espèces bactériennes halophiles et halotolérantes ont été isolées dans divers environnements salins et hypersalins, elles sont incluses dans les 5 phyla du domaine des *Bacteria* : *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* et *Bacteroidetes* (**Oren ,2002**).

Les membres du phylum *Firmicutes* sont hautement divers aux niveaux morphologique et physiologique. La famille des *Bacillaceae* appartenant à ce phylum et est la plus importante avec 21 genres incluant le genre *Bacillus* (**Ludwig et al., 2008**).

3- Les *Bacillus* halophiles et halotolérants

3.1-Taxonomie du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* appartient au phylum des *Firmicutes*, découvert pour la première fois en 1872 par Ferdinand Cohn. Les membres ce genre sont des bactéries à Gram positif, formant des endospores. Ils se distinguent des autres bactéries formant des endospores par leur morphologie cellulaire (en forme de bâtonnet généralement), aérobies ou aéroanaérobie facultatifs, par la production de catalase et par leur distribution ubiquitaire (Nicholson, 2002).

Ce genre englobe une variété d'espèces phénotypiquement hétérogènes, présentant un large éventail de besoins nutritionnels, de diversité physiologique et métabolique ainsi que dans la composition en base d'ADN (Claus et Berkeley, 1986).

Historiquement, les espèces ont été regroupées en six grands groupes basés sur de nombreux caractères physiologiques, biochimiques et morphologiques (Priest *et al.* , 1993), ainsi que sur la capacité à former des spores (Jonson, 1989) comme le montre le **tableau n° 4**.

Les études de la taxonomie numérique ont été un succès pour l'analyse des *Bacillus* provenant des sols et ont contribué à la compréhension de la distribution des espèces de ce genre. La classification moderne est basée sur l'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S. Des recherches récentes utilisant cette analyse ont confirmé des niveaux élevés d'hétérogénéité phylogénétique dans ce genre (Garveba *et al.*, 2003).

Rosler *et al.* (1991) regroupent neuf espèces du genre *Bacillus* en quatre groupes. Ash *et al.* (1991) ont séparé 51 espèces du genre *Bacillus* en cinq groupes phylogénétiquement distincts.

Les caractérisations génotypiques et phénotypiques complémentaires au niveau des espèces du genre *Bacillus* sélectionnées ont mené à la création de nouveaux genres multiples : *Amphibacillus* (Niimura *et al.*, 1990), *Alicyclobacillus* (Wisotzkey *et al.*, 1992) ,*Paenibacillus* (Ash *et al.*,

1993), *Aneurinibacillus* et *Brevibacillus* (Shida *et al.*, 1996a), *Virgibacillus* (Heyndrickx *et al.*, 1998), *Gracilibacillus* et *Salibacillus* (Wäinö *et al.*, 1999), *Filobacillus* (Schlesner *et al.*, 2001), *Geobacillus* (Nazina *et al.*, 2001), *Ureibacillus* (Fortina *et al.*, 2001), *Jeotgalibacillus* et *Marinibacillus* (Yoon *et al.*, 2001).

De ce fait, l'image finale de la taxonomie du genre *Bacillus* est encore loin d'être établie car de nombreuses espèces initialement décrites comme *Bacillus* ont été transférées vers des genres voisins. Néanmoins, Le genre *Bacillus* comprend plus de 200 espèces et est l'un des plus grands genres bactériens (Logan *et al.*, 2007).

Tableau n° 4 : Classification du genre *Bacillus* (Priest *et al.*., 1993).

Groupes	Espèces représentantes	Caractéristiques
Groupe I	<i>B. polymyxa</i> <i>B. subtilis</i> ,	Anaérobies facultatives, fermentent une variété de sucres. Besoins de croissance : vitamines et acides aminés. Sécrètent : amylases, glucanases pectinases et pullulanases.
Groupe II	<i>B. pumilus</i> , <i>B. licheniformis</i> et <i>B. amyloliquefaciens</i>	Endospores ovales, aérobies stricts pour la plus part des espèces. Certaines espèces sécrètent de nombreuses enzymes extracellulaires : les β-glucanases et protéases.
Groupe III	<i>Brevibacillus brevis</i>	Taxonomiquement moins définis.

Groupe IV
B. sphaericus,
B. insolitus,
 et *B. psychrophilus*.

Groupe phylogénétiquement homogène.
 Tous aérobies stricts.

Méso-diaminopimélique du peptidoglycane est remplacé par de la lysine ou de ornithine.

Groupe VI
B. stearothermophilus

Thermophiles. Groupe physiologiquement et morphologiquement hétérogènes.

Métabolisme diverses allant de la aérobies stricts à des types microaérophiles.

Thermophiles acidophiles.

Groupe VII
Alicyclobacillus
 (genre)

3.2-Les *Bacillus* halophiles et halotolérants

Bien que les *Haloarchaea* sont mieux adaptées aux salinités élevées, les *Bacillus* halophiles et halotolérants sont largement répartis dans différents environnements salins et hypersalins (McGenity *et al.*, 2000).

Les espèces halophiles du genre *Bacillus* et apparentées sont caractérisées par une croissance optimale dans un milieu contenant 3 à 15% (p / v) de NaCl (Ventosa *et al.*, 1998). On retrouve des espèces légèrement halophiles comme *Bacillus xiaoxiensis* (Chen *et al.*, 2011) , des espèces modérément halophiles comme *Bacillus chagannorensis* (Carrasco *et al.*, 2007a) et *Bacillus coahuilensis* (Cerritos *et al.*, 2008).

De nombreux *Bacillus* halotolérants ont été décrits et qui peuvent croître entre 0 à 10% (p / v) de NaCl comme *Bacillus luteolus* (Shi et al., 2011) et *Bacillus seohaeanensis* (Lee et al., 2006).

D'autres espèces du genre *Bacillus* ne sont pas concernées que par la salinité mais aussi par l'alcalinité c'est le cas de *Bacillus aurantiacus* (Borsodi et al., 2008), de *Bacillus okhensis* (Nowlan et al., 2006) et de *Bacillus neizhouensis* (Chen et al., 2009).

3.3-Niche écologique des *Bacillus* halophiles et halotolérants

La diversité des propriétés des habitats salins et hypersalins sur terre est reflétée par la grande diversité au sein des communautés microbiennes adaptées à la vie sous les conditions dominantes. En effet, la vie microbienne peut être trouvée sur un éventail extrême de concentrations en sel ; passant de l'eau douce (contenant moins de 0,5 g/l de sel dissous), à l'eau de mer et enfin aux environnements hypersalins (Oren, 2006).

Il a été toujours considéré que les environnements hypersalins sont uniquement habités par les *Haloarchaea*, mais les méthodes moléculaires ont permis de mettre en évidence une présence bactérienne autre que les *Archaea* (Benlloch et al., 2002).

Le genre *Bacillus* est largement distribué dans la nature. Bien que le principal réservoir soit le sol, de nouvelles espèces du genre *Bacillus* provenant des milieux extrêmes ont été décrites récemment démontrant leur ubiquité qui est, en partie, attribuée à leur capacité à former des spores résistantes, et qui peuvent être transportées sur de longues distances (Nicholson et al., 2000).

La plupart des espèces halotolérantes et halophiles du genre *Bacillus* ont été isolées des dans les plans d'eaux *thalassohalines* et *athalassohalines*, et dans de rares cas, elles ont été caractérisées dans des environnements non-salins (Yoon et al., 2003 ; Vargas et al., 2005).

Les plans d'eaux *thalassohalines* (du grec *thalasso*, la mer) proviennent des eaux marines qui se concentrent par évaporation favorisées par une précipitation restreinte de telle sorte que lors des phases antérieures de ce processus, ces eaux ont une composition en sel semblable à celle l'eau de mer (Litchfield et Gillevet ,2002) et le pH est proche de la neutralité à légèrement alcalin.



Figure n° 2 : Photos des *plans thalassohalins* : Marais salants de Costa Blanca en Espagne (à droite) et à San Francisco au USA (à gauche) (Falb *et al.* , 2005).

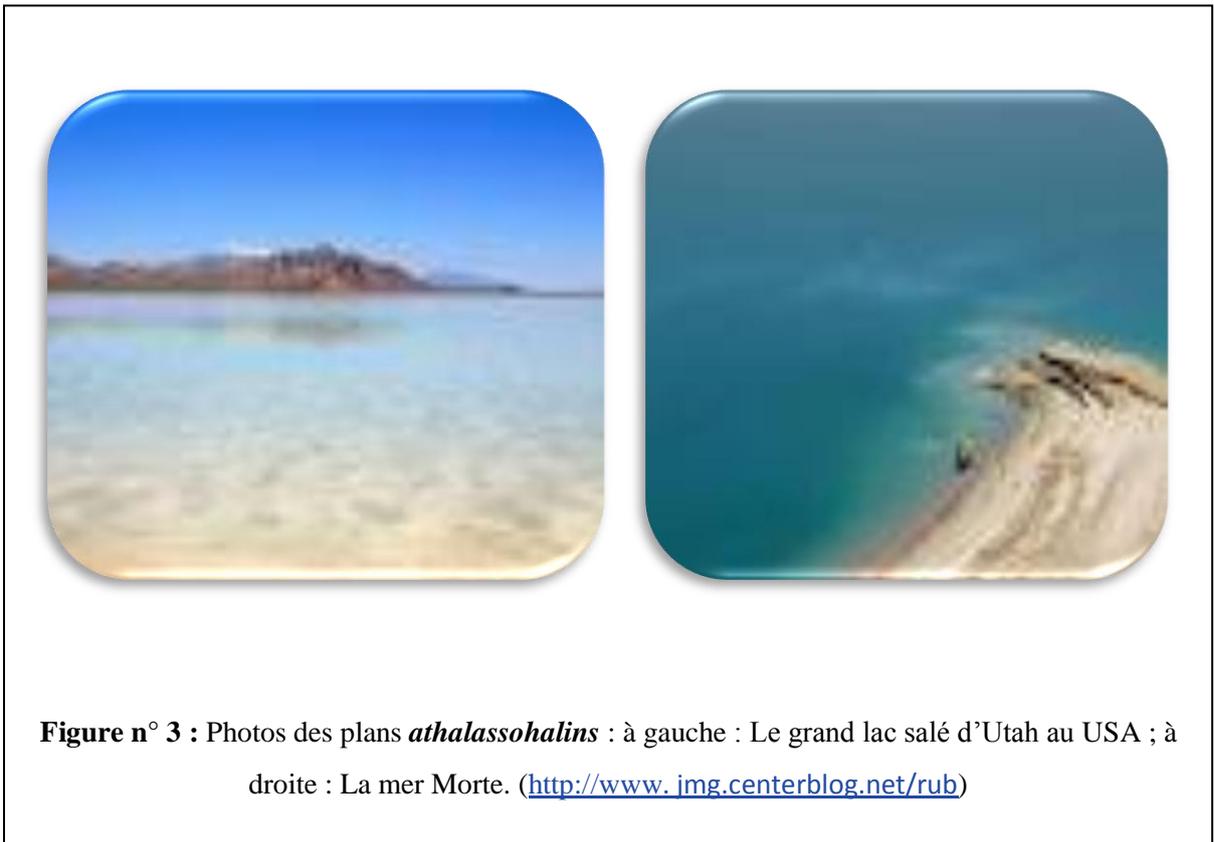
Comme l'évaporation progresse, les minéraux deviennent plus concentrés et éventuellement se précipitent dans l'ordre suivant : calcite (CaCO_3), le gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), l'halite, sylvinite (KCl) et enfin carnallite ($\text{KCl} \cdot \text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Grant, 2004). La concentration finale des plans *thalassohalins* est dominée par le magnésium et les ions de chlorure mais durant l'évaporation, certains changements peuvent survenir dans la composition ionique des gypses ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ou des autres minéraux (Oren ,2002).

De nombreuses bactéries ont été caractérisées dans ces systèmes *thalassohalins*, notamment des représentants du genre *Bacillus* comme *Bacillus okhensis* qui une espèce halotolérante et alcalotolérante retrouvée en Inde (Nowlan *et al.*,2006) et *Bacillus halochares*, une espèce halophile isolée à partir des marais salants en Grèce (Pappa *et al.* ,2010).

Par contre les eaux *athalassiques* sont celles dans lesquelles les sels ont des proportions non marines, on trouve par exemple après la concentration d'eau de mer qui conduit à la précipitation du NaCl, une forte concentration de potassium. Ce point marque la limite supérieure de la résistance de toutes les formes biologiques (DasSarma et Arora ,2002).

Cependant, une des différences les plus importantes entre les plans *thalassohalins* et *athalassohalins* est le pH. Comme mentionné précédemment, *les eaux thalassohalines* sont légèrement plus alcalines que l'eau de mer à partir de laquelle elles ont été établies. Cela est principalement dû à la précipitation des carbonates de calcium en excès sous forme de calcite. Dans les systèmes *athalassohalins*, les eaux sont typiquement déficient en Ca^{2+} et Mg^{2+} ainsi, le système tend à générer un pH acide (Grant et McGenity, 1998).

Les plans d'eaux *athalassohalines* les mieux étudiier sont la mer Morte, Lac Magadi au Kenya, Wadi Natroun en Egypte et qui sont dominées par le potassium, le magnésium, ou le sodium (Litchfield et Gillevet, 2002 ;Oren, 2002).



Il y a des rapports démontrant la présence bactérienne dans la Mer Morte. Des bactéries halophiles appartenant au genre *Bacillus* ont été retrouvées, en particulier *B. marismortui* (Chookietwattana, 2003).

4-Stratégies utilisées pour l'osmoadaptation

Une diversité considérable existe également dans les mécanismes d'adaptation des microorganismes halophiles et halotolérants à la forte pression osmotique exercée par leur milieu environnant fortement salin. Tous les microorganismes halophiles partagent une propriété fondamentale : leur cytoplasme doit être au moins isoosmotique avec leur milieu environnant.

A l'heure actuelle, les bactéries modérément halophiles et halotolérantes du genre *Bacillus* posent beaucoup de questions intéressantes, en particulier ceux concernant leur capacité à se développer sur de larges plages de concentrations en NaCl (**Tiquia et al ., 2007**).

Généralement, il y a deux stratégies utilisées par les bactéries halophiles pour maintenir une bonne pression osmotique dans le cytoplasme : l'accumulation du KCL qui n'est pas largement utilisé au sein des différents groupes phylogénétiques et physiologiques des halophiles, elle est surtout connue au niveau des *Archaea* et bactéries extrêmement halophiles (**Oren ,2008**) ou bien la biosynthèse et/ou l'accumulation de solutés compatible (**Sigliocco et al ., 2011**).

4.1- Biosynthèse et/ou l'accumulation de solutés compatibles

Les bactéries qui vivent dans les milieux hypersalins s'accumulent des solutés organiques qui n'interfèrent pas avec l'activité enzymatique normale .Ces molécules appelées «solutés compatibles» utilisées pour l'équilibre osmotique comprennent des polyols et leurs dérivés, les sucres et dérivés, les acides aminés et dérivés, les bétaïnes, l'ectoïnes et occasionnellement les peptides convenablement modifiés pour supprimer les charges (**Galinski ,1995**) .Des exemples de ces molécules sont mentionnés dans le **tableau n° 5**.

Cette stratégie consiste à exclure le sel du cytoplasme, et à accumuler des solutés organiques- qui peuvent être soit synthétisées par la cellule ou transportées à l'intérieur de la cellule à partir du milieu- afin d'assurer l'équilibre osmotique (**Vargas et al ., 2008 ; Bursy et al ., 2008**). Elle est adoptée par les membres du domaine des *Bacteria*. Les microorganismes qui utilisent cette stratégie peuvent souvent s'adapter à un large éventail de concentrations en sel (**Oren ,2008**). En règle générale, les bactéries et les eucaryotes accumulent habituellement des solutés compatibles neutres, tandis que les *Archaea* préfèrent les solutés chargés négativement (**Roberts ,2004**).

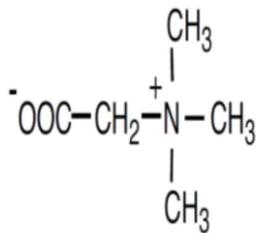
Tableau n° 5 : Quelques exemples de solutés compatibles (Roberts, 2005).

Solutés zwitterioniques

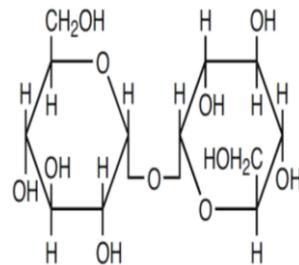
Solutés non chargés

Solutés anioniques

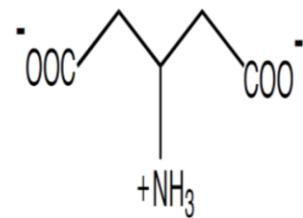
betaine



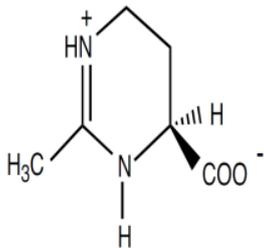
trehalose



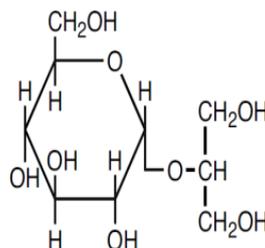
β -glutamate



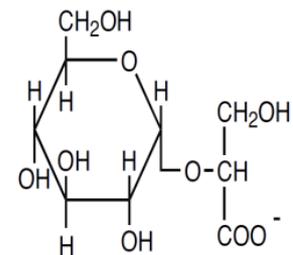
ectoïne



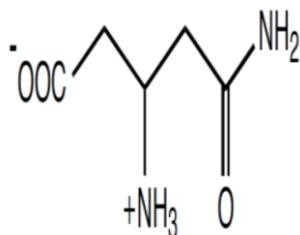
α -glucosylglycerol



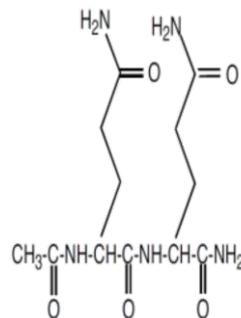
α -glucosylglycerate



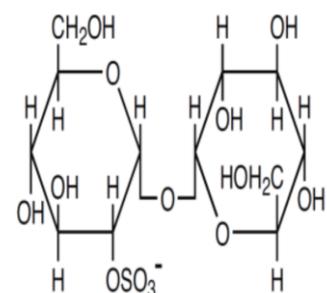
β -glutamine



N-acetylglutaminylglutamine amide



sulfotrehalose



L'accumulation de ces solutés contribue à maintenir la turgescence, la pression, le volume des cellules et la concentration d'électrolytes donc tous les éléments importants pour la prolifération des cellules (**Roberts ,2005**).

Plusieurs études ont montré que les osmolytes tels que l'ectoïne peut servir comme protecteur de stress général car il est produit en réponse au sel et à des contraintes thermiques (**Vargas et al ., 2008 ; Bursy et al ., 2008**). Bien que l'ectoïne soit généralement classé comme un osmoprotecteur, il a également été signalé qu'il joue un rôle crucial dans la stabilisation des protéines et le repliement correct des polypeptides dans des conditions dénaturantes (**Bursy et al ., 2008**).

Il est pensé que les événements initiaux pour déclencher l'accumulation des osmolytes pourraient inclure des canaux ioniques ou d'autres protéines transmembranaires qui détectent les différences de concentration en sel interne et externe, les variations de volume cellulaire et / ou les changements de la pression de turgescence. Cependant, à l'exception des transporteurs, la façon dont ces changements physiques sont convertis à la synthèse accrue des osmolytes n'est pas encore élucidée (**Roberts ,2005**).

5- Intérêts biotechnologiques des *Bacillus* halophiles et halotolérants

Les bactéries du genre *Bacillus* sont très utilisées pour des applications en biotechnologie telles que la lutte biologique contre les ravageurs dans l'agriculture, la production d'insecticides, d'antibiotiques et des enzymes (**Souza et al., 2005 ; Guo et al., 2006**).

Les bactéries halophiles et halotolérantes du genre *Bacillus* sont une catégorie intéressante de microorganismes extrêmophiles qui se sont adaptées aux rudes conditions hypersalines. Elles offrent des applications potentielles dans divers domaines de la biotechnologie (**Margesin et Schinner ,2001**).

Selon **Oren (2002b)**, l'utilisation de ces bactéries en biotechnologie peut être divisée en 3 catégories :

- 1^{ère} catégorie : l'halotolérance de plusieurs enzymes extraites peut être exploitée à chaque fois que la transformation enzymatique requière une faible activité d'eau : c'est le cas d'un milieu à concentration élevée en sel ;

- 2^{ème} catégorie : certains stabilisateurs osmotiques présentent des applications intéressantes (éctoine et hydroxyéctoine) ;

- 3^{ème} catégorie : certains peuvent produire des composés de valeurs, le plus souvent sans aucune relation directe avec leurs propriétés halophiles.

5.1- Enzymes

Dans l'industrie des enzymes, les bactéries du genre *Bacillus* constituent la source majeure d'enzymes hydrolytiques utilisées surtout dans le domaine alimentaire et dans celui des détergents. Plus des deux tiers des enzymes produites industriellement par des bactéries, le sont par des espèces du genre *Bacillus* (**Devine, 1995**).

Par rapport à l'utilisation étendue des extrêmozymes issues des bactéries et des archées thermophiles et alcalophiles, très peu d'enzymes halophiles ont jusqu'ici trouvé des applications en industrie et en biotechnologie. En partie, ceci est dû à la demande limitée des enzymes osmotolérantes dans la fabrication courante (**Eichler, 2001**).

Récemment, les bactéries halotolérantes du genre *Bacillus* produisent des hydrolases industriellement importantes et leurs activités enzymatiques sont plus diverses. De plus, elles sont métaboliquement plus versatiles que les archées halophiles (**Rohban et al., 2009**).

5.1.1-Les protéases

Les protéases représentent l'un des plus grands groupes d'enzymes utilisées dans l'industrie et représentent 60% du total de la vente dans le monde entier. La grande diversité des protéases, contrairement à la spécificité de leur action, a attiré l'attention des scientifiques dans une tentative d'exploiter leurs capacités biotechnologiques (**Rao et al ., 1998**).

Elles sont généralement utilisées comme additives dans les détergents de blanchisserie, dans la transformation des produits alimentaires, pharmaceutiques et dans les industries de tannage de cuir aussi bien que dans la gestion des déchets (**Amoozegar et al., 2007; Karbalaie-Heidari et al., 2009**).

Les protéases issues des bactéries halotolérantes et halophiles modérées fonctionnent à une haute concentrations en sel (**Ventosa et al., 1998**). Malheureusement elles n'ont pas été étudiées en détail (**Joo et Chang, 2005**). Elles ont été isolées et caractérisées à partir de plusieurs espèces bactériennes halophiles et halotolérantes du genre *Bacillus sp.* (**Setyorini et al., 2006 ; Shivanand et Jayaraman, 2009**).

5.1.2-Les lipases

Elles sont utilisées en biocatalyse asymétrique et constituent une voie prometteuse pour obtenir des composés énantiomériquement purs ou enrichis (**Ghanem, 2007**).

Pour l'instant de nombreuses études ont permis de révéler plusieurs activités lipolytiques dans le monde des halophiles. Les souches ont été identifiées comme membres des genres apparentés au genre *Bacillus* et qui sont *Oceanobacillus*, *Thalassobacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus* et *Gracilibacillus*. Ces microorganismes produisent des lipases actives en présence de fortes concentrations salines (**Rohban et al., 2009**).

5.1.3-Les cellulases

Les cellulase se réfèrent à une classe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons 1, 4 β -D glycosidiques et sont principalement produites par les champignons, les bactéries et notamment les bactéries halophiles (**Beguin et Aubert, 1994**) et ont un large éventail d'applications dans les industries du textiles pour le bioblanchiment des tissus, aussi bien que dans les détergents de blanchisserie utilisés pour ramollir les tissus (**Kaur et al., 2007**).

Actuellement, des cellulases halophiles dérivées de *Bacillus sp.* ont été caractérisées. Elles sont thermostables et également stables à l'alcalinité et à la salinité ce qui fait d'elles des candidates idéales pour différentes applications industrielles (**Aygan et al., 2008**).

5.1.4- Autres enzymes

Les bactéries halophiles et halotolérantes du genre *Bacillus* sont des bonnes productrices de d'autres enzymes comme la DNase, les amylases, les gélatinases ect..., qui sont capables de fonctionner dans des conditions qui conduisent à des précipitations ou à la dénaturation de la plupart des autres enzymes (**DasSarma et Arora ,2002**).

Elles jouent un rôle important dans de nombreux procédés biotechnologiques (**Sinchaikul et al., 2002; Cherry et Fidantsef, 2003**) , car elles rivalisent efficacement avec le sel pour l'hydratation, une propriété qui peut entraîner une résistance à toute autre activité de l'eau, comme en présence des solvants organiques (**Kerkar, 2004**).

5.2-Production des composés antimicrobiens

Le genre *Bacillus* a le potentiel de produire plus de 45 molécules antimicrobiennes ; certains de ces composés ont une valeur clinique, d'autres sont testés in vitro pour contrôler les maladies des plantes et dans la conservation des denrées alimentaires. En fonction de leur voie de biosynthèse, ces

métabolites peuvent être regroupés en deux catégories différentes : la première classe comprend les peptides ribosomiques synthétisés, y compris les bactériocines tandis que la seconde classe comprend les petits peptides synthétisés par voie enzymatique ou par des voies non-ribosomiques (Stein, 2005).

Très peu de rapports sont disponibles sur le potentiel producteur des composés antimicrobiens par les bactéries halotolérantes du genre *Bacillus*. De ce fait, de nombreuses études se sont orientées vers la recherche de ces bactéries afin d'offrir de nouvelles perspectives dans le domaine pharmaceutique, agricole et alimentaire avec une possibilité de trouver « de nouvelles molécules antimicrobiennes » (Kamat et Kerkar, 2011).

5.2.1- Production des antibiotiques

Face au problème de l'émergence de la résistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes, les chercheurs se sont orientés vers l'exploitation de nouvelles niches écologiques notamment les milieux hypersalins dans le but de trouver de nouvelles souches productrices de ces substances. Diverses bactéries halotolérantes et halophiles se sont révélées une source précieuse pour la découverte de composés bioactives ayant des structures uniques (Blunt *et al.*, 2006).

Les bactéries qui offrent une grande production de ces molécules sont celles qui appartiennent au genre *Bacillus* (Pinchuk *et al.*, 2001). En effet, ce genre est réputé par la production des antibiotiques contre les bactéries, les champignons et les levures. La synthèse de ces substances inhibitrices est décrite par différentes espèces, telles que *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymixa*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus*, *B. brevis*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. circulans* et *B. licheniformis* (Whipps, 2001 ; Stein, 2005) et sont généralement produites au début de la sporulation (Schallmey *et al.*, 2004).

Des espèces bactériennes du genre *Bacillus* ont été isolées à partir de divers milieux hypersalins et se sont avérées productrices des métabolites antimicrobiens. Des molécules nommées macrolactine F, 7-O-succinylmacrolactin F et 7-O-succinylmacrolactin A, ont été synthétisées par

Bacillus sp. (Sc026) (**Jaruchoktawechai et al., 2000**) et trois bactériocine peptidiques nommées lichénine, Bacillocin 490 et P40 produites par *B. licheniformis* P40, (**Cladera-Olivera et al., 2004**).

L'étude de **Kamat et al. (2011)** a mis en évidence la production de composés antibactériens par *B. marismortui*, bactérie halotolérante isolée à partir de lac salé en Inde. Cette espèce n'était pas connue par sa capacité à produire des composés antibactériens.

5.2.2- La lutte biologique

L'intérêt pour la lutte biologique contre les agents pathogènes pour les plantes a augmenté au cours de cette dernière décennie dû à l'importance à utiliser des alternatives respectueuses pour l'environnement d'une part et éviter l'utilisation intensive des pesticides chimiques d'une autre part (**Ongena et Jacques, 2008**). Ce contrôle n'est pas seulement une alternative aux pesticides chimiques, mais il peut également assurer le contrôle des maladies qui ne peuvent être gérées (ou partiellement gérées) par d'autres stratégies (**Cook, 1993**).

La plupart des espèces du genre *Bacillus* sont bien connues pour leur capacité à contrôler les maladies des plantes et sont considérées comme des microorganismes sans danger. Les bactéries halotolérantes et halophiles de ce genre possèdent des capacités remarquables à synthétiser de nombreuses substances par le biais de divers mécanismes et qui ont été utilisées avec succès dans l'agriculture et pour l'industrie fine (**Stein, 2005**).

Les métabolites secondaires produits par ces souches ont montré une activité antifongique contre les différents phytopathogènes (**Yu et al., 2002 ; Ongena et Jacques, 2008**).

En effet, les travaux de l'équipe de **Sadfi-Zouaoui (2008)** ont montré que certaines souches bactériennes du genre *Bacillus* isolées de différents sols hypersalins pourraient inhiber certains champignons pathogènes pour les plantes.

L'équipe d'**Essghaier (2011)** a montré que l'espèce halotolérante *Bacillus subtilis* J9 possède un pouvoir inhibiteur contre les champignons responsables de la pourriture grise des fraises.

De même, l'étude de l'équipe de **Rebib (2012)** a pu mettre en évidence une activité in vitro de *Bacillus subtilis* SR146 isolé du sol salé tunisien contre plusieurs espèces de *Fusarium*. Ces composés qui sont responsables de cette activité antifongique ont été purifiés et caractérisés par spectrométrie de masse révélant ainsi leur grande similitude avec la fengycine. L'amplification par la PCR du gène correspondant à la biosynthèse de la fengycine au niveau de cette souche confirme la spectrométrie de masse. Outre la fengycine, aucun autre composé antifongique n'a été détecté. En effet les composés lipopeptidiques et oligopeptidiques synthétisés de manière non ribosomiques (**Moyne et al., 2001**), représentent la classe la plus courante de composés antifongiques produite par les espèces du genre *Bacillus* (**Stachelhaus et al., 2002**).

5.3-Fermentation des aliments

Les bactéries halotolérantes jouent un rôle essentiel dans divers procédés de fermentation qui se réalisent en présence de sel. En catalysant la fermentation, ces microorganismes produisent divers composés qui donnent les caractéristiques organoleptiques des produits résultants.

Les espèces du genre *Bacillus* ont été retrouvées dans la saumure de cornichons dont la concentration de sel était en augmentation progressive (de 5% à 15,9% (p / v) NaCl), mais aussi dans la fermentation de la choucroute qui a lieu en présence de 2,25% à 2,5% (p / v) de sel. (**Margesin et Schinner ,2001**)

5.4-Production d'autres composés

Le pouvoir des bactéries halotolérantes et halophiles du genre *Bacillus* s'étant aussi vers la production de d'autres produits du métabolisme secondaire à titre d'exemple : les alcools aliphatiques, les lactones, les esters, les cétones. Leurs applications ont été rapidement reconnues à cause de leur

utilisation dans le domaine de la recherche en tant qu'antibiotiques, d'enzymes, des inhibiteurs d'enzymes et d'autres composées pharmaceutiques (**Zaitlin et Watson, 2006**).

Bien que l'utilisation commerciale des bactéries halophiles et halotolérantes soit assez significative, de nombreuses et uniques propriétés de ces microorganismes suggèrent qu'elles ont un potentiel encore plus grand pour la biotechnologie. Ces bactéries peuvent survivre et s'épanouir dans environnements qui limitent la croissance de la plupart des autres microorganismes (**Rodriguez-Valera ,1991**).

Matériel et méthodes

I – Identification phénotypique et génotypique de la souche nommée ML9831

Au cours de ce travail qui a été réalisé durant la période de Février à Juillet 2012, nous avons réalisé :

- Une identification de la souche bactérienne nommée **ML9831** sur le plan phénotypique et génotypique ;
- une pré-caractérisation de l'activité antimicrobienne autant que bactérie extrêmophile.

I.1-Origine de la souche

L'isolat bactérien nommé **ML9831** a été isolé lors des travaux de Magister du **Dr Khelil Klouche (1998)** et a été conservé à -80°C dans un laboratoire Français (IRD de Marseille). Cette souche fait partie d'une collection provenant d'un screening visant à la découverte de nouveaux taxons et d'évaluer leurs propriétés biotechnologiques, elle est mésophile et fut attribuée au genre *Bacillus* (**Khelil Klouche ,1998**).

I.2-Description du site d'EL Goléa

La souche provient du site n° 1 de la sebkha d'EL Goléa (sebkha El Malah) située à 12 kilomètres d'El Meniâa (El Goléa), à 5 kilomètres de Hassi EL Gara et à 280 kilomètres au Sud- Ouest de la ville de Ghardaïa, chef lieu de wilaya.

S'inscrivant en 2006 dans la liste de **Ramsar** avec 3 critères sur 8 (3.4.6), la sebkha est d'une salinité modérée, très riche du point de vue biodiversité. Le climat est de type aride avec des vents dominants de Nord et Nord-Est, ceux venant de l'Est et du Sud-Est sont les plus dangereux car ils transportent des sables. Les périodes ventées sont de Novembre à Décembre et Mars. La pluviométrie dépasse rarement 20 mm par an. Un taux élevé d'évaporation (212 mm / an) surtout pendant la saison sèche augmentant ainsi la salinité qui peut atteindre jusqu'à 30% (p / v) (**Hacène et al., 2004**).

C'est un écosystème qui présente des caractéristiques extrêmes. Les résultats de l'analyse physico-chimique de ce lac réalisés par **Boutaiba *et al.* (2011)** sont mentionnés dans le **tableau n°6** et montrent qu'il y a une forte concentration des ions de sodium et du chlorure soit environ 10 fois supérieur à celle trouvée dans l'océan Atlantique, et ce dans le cas de la plupart des écosystèmes hypersalins, de plus le pH tend vers l'alcalinité.

Tableau n° 6 : Propriétés chimiques et physiques du lac d'El Goléa comparés avec ceux de l'Océan Atlantique (**Boutaiba *et al.*, 2011**).

Ecosystème	Propriétés chimiques et physiques								
	pH	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	HCO ₃	Salinité
Le lac d'El Goléa	9.0	107	nd.	0.3	0.4	198	n.d.	n.d.	296
Océan Atlantique	8.5	10.6	0.38	1.29	0.42	19.2	2.68	0.14	34.85

nd : non déterminé

Le site n°1 d'où provient la souche se caractérise par :

- Début du lac proche de la ville (peu de sel) ;
- égouts, riche en matière organique ;
- arbustes, plantes, animaux ;
- mare stagnante, vase noirâtre ;
- couleur : trouble avec des suspensions verdâtres.



I.3- Revivification et purification de la souche

La **ML9831** a été isolée à partir du lac sur milieu **Pringsheim** (voir annexe1) additionné de 30% (p / v) de NaCl (**Khelil Klouche ,1998**).

La revivification de la souche a été réalisée sur milieu de culture liquide **KN** conçu additionné de 10% (p / v) de NaCl -autre que le milieu **Pringsheim** - dont la composition est mentionnée dans l'annexe 1 ; durant 6 jours à 30°C sous agitation. La purification a été réalisée par un passage successif sur ce même milieu solide et liquide additionné tous les deux de 10% (p / v) de NaCl pour éviter toutes contamination.

Une fois la souche purifiée, la recherche s'est orientée vers l'identification de l'isolat en suivant les recommandations faites par **Logan et al. (2009a)** pour la description de nouveaux taxons dans l'ordre des *Bacillales* (voir annexe 2).

La souche pure est conservée sur gélose nutritive inclinée à 4°C pendant trois mois et à 0°C sur milieu **KN** liquide sans NaCl contenant 15 % (v/v) de glycérol au niveau du la **Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-Alimentaire Au Biomédicale et à l'Environnement (LAMAABE)**.

I.4-Identification phénotypique de l'isolat

I.4.1-Caractérisation morphologique de la souche

I.4.1.1-Aspect microscopique

La mobilité de la souche a été vérifiée par un été frais sur des cultures jeunes. Les endospores sont mises en évidence dans le corps bactérien sur des cultures âgées en faisant une coloration négative par application, après fixation, d'une solution au bleu de méthylène pendant 5 minutes (**Harley et Prescott, 2002**).

La morphologie, l'arrangement cellulaire et le Gram de l'isolat sont déterminés sur des cultures jeunes par la technique de coloration différentielle décrite par **Gram (1884)** à l'aide d'un microscope optique (ZEISS - Weast Germany).

I.4.1.2-Aspect macroscopique

La forme, la taille et la pigmentation des colonies ont été déterminées après croissance sur milieu **KN** solide additionné de 10% de NaCl après une incubation de 6 jours à 30°C.

I.4.2-Caractérisation physiologique

L'influence de la concentration en NaCl, de la température et du pH sur la croissance a été déterminée en variant un des paramètres alors que les deux autres sont maintenus constants. La croissance était suivie durant 72 heures et la densité optique était mesurée chaque 6 heures à une longueur d'onde de 590 nm.

1.4.2.1-Influence de la concentration en NaCl

L'effet de la concentration en NaCl sur la croissance de la souche a été déterminé selon la méthode décrite par **Joshi *et al.* (2008)**. La **ML9831** a étéensemencée dans son milieu de culture liquide **KN** à pH 7,0 et à des concentrations en NaCl allant de 0 ; 2.5 ; 5.0 ; 7.5 ; 10.0 ; 15.0 ; 17.5 ; 20.0, 25.0 et 30.0% (p/v), respectivement. L'incubation de la souche a été faite à 30°C.

1.4.2.2 -Effet du pH

L'influence du pH sur la croissance a été déterminée par l'ensemencement du milieu liquide **KN** exempt de sel à des pH variant de 2.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0 et 13.0. L'incubation de la souche a été faite à 30°C.

1.4.2.3- Température optimale de croissance

L'incubation du milieu liquide **KN** exempt de sel à pH= 7,0ensemencé par la souche a eu lieu à 4 ; 25 ; 30 ; 37 ; 45 et 55°C.

I.4.3- Caractérisation biochimique

1.4.3.1-Mise en évidence des enzymes respiratoires

1.4.3.1.1- Recherche de la catalase

C'est une enzyme catalysant la décomposition de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Sur une lame propre contenant une parcelle de la culture, l'eau oxygénée à 10 Volumes a été déposée. Si la bactérie possède cette enzyme, alors un dégagement gazeux sera observé (**Leyral et Vierling, 2007**).

1.4.3.1.2-Recherche de la cytochrome-oxydase

La recherche de la cytochrome-oxydase a été effectuée à l'aide de disques «Ox» dont la zone réactionnelle est composée d'un papier filtre imprégné de N,N-diméthyl-1,4-phénylène diamine-dichlorure.

A partir d'un milieu solide, une partie de la colonie a été déposée sur un disque oxydase placé sur une lame, à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (**Joffin et Leyral, 2006**).

1.4.3.1.3-Type respiratoire

Ce test a été effectué selon les recommandations de **Guiraud (1998)**. La gélose viande foie (VF) répartie en tube et régénérée par un chauffage durant 30 minutes au bain-marie bouillon. L'ensemencement a été réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur plongée au fond du tube, puis remontée en décrivant une spire, de façon à ensemer uniformément le milieu sur toute la hauteur. Après refroidissement, le milieu est mis en incubation à 30 °C pendant 24 à 48 heures.

1.4.3.1.4-Réduction du nitrate

Les espèces bactériennes peuvent être différenciées sur la base de leur capacité à réduire le nitrate en nitrite ou en gaz azoté. La réduction des nitrates peut être couplée à la respiration anaérobie chez certaines espèces.

Ce test a été réalisé sur tube contenant le bouillon nitrate- voir l'annexe 1-inoculé par l'isolat bactérien **ML9831** et incubé pendant 24 à 48 heures à 30 °C.

La révélation a été faite par ajout de 5 gouttes de réactif A et 5 gouttes de réactif B – dont les compositions sont mentionnées dans l'annexe 1- dans le tube test suivi d'une agitation afin de mélanger les réactifs avec le milieu. Si une couleur rouge ou rose se développe en quelques minutes cela indique la réduction des nitrates en nitrite.

Si aucune couleur ne se révèle après l'addition des réactifs A et B, une petite quantité de la poudre de zinc doit être ajoutée dans le milieu, le tube est laissé au repos à une température ambiante pendant 10 à 15 minutes. Si le milieu vire au rose après l'ajout de la poudre de zinc, les nitrates sont encore présents dans le milieu et sont réduits en nitrites par le zinc, donc la souche ne possède pas la Nitrate réductase. Si le milieu reste incolore après l'addition de la poudre de zinc, les nitrates sont réduits par les bactéries jusqu'au stade azote, donc la souche possède la Nitrate réductase. L'apparition de gaz dans la cloche de Durham indique la réduction des nitrates en azote gazeux (**De VOS et al., 2009**).

1.4.3.2-Mannitol mobilité

C'est une gélose molle conditionnée en tubes qui permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries.

L'ensemencement a été réalisé par piqûre centrale jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une pipette Pasteur. La fermentation du mannitol se matérialise par un virage du milieu au jaune. Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble dans le milieu alors que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement (**Gerhardt et al., 1994**).

1.4.3.3-Plaques API 20E

Les autres tests biochimiques : recherche de la β -galactosidase (ONPG), de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH), production d' H_2S , utilisation du citrate, production d'indole et réaction de Voges-Proskauer, liquéfaction de la gélatine et la dégradation des sucres ont été réalisés en utilisant la plaque **API 20E**.

La galerie **API 20E** comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans l'API médium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation de 24 heures à 30°C se traduisent par des virages de couleur spontanés ou par l'addition des réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique (**Biomérieux, 2006**).

1.4.3.4- Hydrolyse de l'esculine

Ce test a été réalisé sur le milieu gélosé contenant la bile à esculine. Après incubation de la culture à 30°C pendant 24 heures, l'hydrolyse de l'esculine libère l'aglycone qui est décelé par une réaction chimique en présence de sel de fer et donne une couleur noire au milieu de culture (**De VOS et al., 2009**).

1.4.3.5-Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

1.4.3.5.1-Test de la DNase

Certaines bactéries sont capables d'hydrolyser l'acide désoxyribonucléique (ADN) grâce à une désoxyribonucléase. La mise en évidence de la production de cette enzyme est réalisée sur une gélose contenant l'ADN et la révélation se fait soit par le HCL ou par le bleu de toluidine.

La **ML9831** a étéensemencée par strie sur la surface de la gélose coulée sur une boîte de Pétri et incubée pendant 24 heures à 30 °C. La révélation a été faite sur un fond noir par l'ajout du HCL. Lorsque l'ADN a été hydrolysé, un halo clair est visible au pourtour de la strie, alors que l'ADN sous l'action du HCL est à l'origine d'un précipité blanchâtre (**Denis et al., 2007**).

1.4.3.5.2- Détermination de l'activité amylolytique

Ce test a été réalisé en cultivant la souche sur une gélose nutritive contenant 1% d'amidon (voir annexe 1). Après avoir obtenue une bonne culture bactérienne, la gélose a été recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est ainsi mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie, par contre un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture (**De VOS et al., 2009**).

1.4.3.5.3 -Détermination de l'activité protéolytique : recherche de la caséinase

L'hydrolyse de la caséine a été étudiée sur un milieu gélosé contenant 5% de lait écrémé (voir annexe 1). Après 48 heures d'incubation à 30°C, la présence de cette activité est détectée par un halo clair autour de la strie indiquant l'hydrolyse de la caséine, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (**De VOS et al., 2009**).

I.4.3.5.4-Détermination de l'activité lipolytique

➤ Hydrolyse du Tween 80

La **ML9831** a été ensemencée en strie sur un milieu spécifique (voir annexe 1) contenant 10 gouttes de Tween 80 (polyxyéthylène sorbitanmonooléate) autoclavé. En cas de réaction positive, il se forme un halo opaque autour de la strie hydrolysant le Tween 80, dû à la précipitation des acides gras (**Sabaou, 1980**).

➤ Test de la lécithinase

Ce test a été réalisé par l'ensemencement de la souche en strie sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile (voir annexe 1). Après 24 à 72 heures d'incubation à 30°C, l'apparition de zone claire autour de la culture prouve que la souche possède la lécithinase (**De VOS et al., 2009**).

I.4.4- Sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé selon les normes du Clinical and Laboratory Standard Institut (**CLSI, 2010**), 11 disques d'antibiotiques (mentionnés dans le **tableau n° 7**) ont été testés contre la **ML9831**.

L'inoculum bactérien de la **ML9831** a été préparé en ensemencant dans 5 ml du bouillon nutritif au moins trois à cinq colonies bien isolées de même type morphologique d'une culture sur milieu gélosé, ensuite une incubation sous agitation (généralement deux à six heures) à 30°C a été réalisée. La turbidité de la culture a été ajustée avec une solution saline stérile ou du bouillon pour obtenir une turbidité équivalente à celle d'un standard Mc Farland 0,5. Il en résulte une suspension contenant environ 1 à 2×10^8 UFC/ml.

La gélose Muller-Hinton a été ensemencée par un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne ; l'opération a été répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et de passer l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Enfin les disques d'antibiotiques ont été appliqués sur la gélose en pressant chaque disque à l'aide de pinces bactériologiques stériles pour s'assurer de leur application et ne doivent pas être déplacés. Les zones d'inhibitions ont été mesurées après 24 heures d'incubation à 30°C et comparées avec les valeurs critiques selon **Bauer et al. (1966)**.

Tableau n° 7 : Disques d'antibiotiques utilisés et leur charge (µg)

Antibiotiques	Charge	Antibiotiques	Charge
Amoxicilline/acideclavulanique	20/10	Kanamycine	30
Pénicilline/novo-boïcine	10/30	Tobramycine	10
Oxacilline	5	Pristinamycine	15
Cefotaxime	30	Rifampine	30
Gentamicine	10	Fosfomycine	10
		Chloramphenicol	30

I.5- Identification génotypique : étude phylogénique de la souche ML9831

L'identification génotypique de la souche nommée **ML9831** a été réalisée au sein du laboratoire **IRD** de Marseille –France, avec la collaboration du **Dr Jean Luc Cayol**. L'analyse est effectuée par la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Gubh ,Braunschweig, Allemagne) ; une comparaison des séquences d'ADN codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal a été réalisée selon la méthode suivante :

I.5.1-Extraction et purification de l'ADN génomique

Cette étape est réalisée pendant la phase exponentielle de la croissance avec un kit de purification d'ADN génomique **Wizard (Promega)** à partir de 5 ml de culture d'après le protocole fourni avec le kit.

I.5.2-Réaction de polymérisation en chaine (PCR) et purification du fragment amplifié

Le principe de cette technique consiste à amplifier une séquence définie d'ADN du génome en le multipliant en grand nombre de fois grâce à une polymérase. L'amplification est réalisée par cycle comprenant les étapes suivantes :

- Dissociation de l'ADN double brin par élévation de la température du milieu réactionnel à 95°C ;
- hybridation des amorces spécifiques des bornes du fragment d'ADN génomique à amplifier (ADN_r-16S) par abaissement de la température ;
- élongation des amorces par la Taq polymérase, après élévation de la température à 72°C.

La purification de l'ADN_r-16S amplifié est réalisée après électrophorèse, par découpage du gel d'agarose. Après élimination de l'agarose, le fragment d'ADN est directement séquencé.

I.5.3-Séquençage et analyse

Les séquences obtenues sont lignées à l'aide d'éditeur de séquence, avec celles des bactéries phylogénétiquement proches dont la séquence est déposée dans la Genbank ou à l'EMBL. Après suppression des nucléotides et des alignements incertains, la matrice des similitudes est construite en utilisant les paramètres de corrélation d'**Olsen(1988)** selon la méthode de **Jukes et Cantor (1969)**.

A partir de cette matrice, l'algorithme de **De Soete (1983)** et une analyse transversale avec le programme **DMAPARS** du logiciel **PHILIPS** de **Felsentein (1993)**, permettent de construire le dendrogramme.

Enfin la topologie de l'arbre phylogénétique est affinée à l'aide des programmes **SEE QBOOT**, **FITCH** et **COMSEMBE** du logiciel **TREECON** par le **Dr Jean Luc Cayol** au sein du laboratoire IRD de Marseille.

II-Pré-caractérisation des activités antimicrobiennes produites par la ML9831

Les bactéries vivant dans les milieux extrêmes et en particulier, les halotolérantes et les halophiles représentent un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales. En effet les bactéries halotolérantes et halophiles peuvent être une nouvelle source de composés bioactifs (**Ventosa et al., 1998**).

Dans cette partie du travail, l'objectif était de se focaliser sur le potentiel producteur des activités antimicrobienne extracellulaires par l'isolat bactérien **ML9831** sur milieu liquide et sur milieu solide contre certaines bactéries test et souches fongiques de référence - mentionnées dans le tableau n° 8- fournies par les 4 équipes du laboratoire **LAMAABE**.

Tableau n°8 : Souches microbiennes test utilisées dans l'activité antimicrobienne

Souches bactériennes	ATCC	Souches bactériennes	ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
<i>Escherichia coli</i>	25922	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	70603	<i>Bacillus cereus</i>	11778

<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
<i>Salmonella enteritidis</i>	2453	<i>Listeria monocytogenes</i>	19115
Levure et Moisissures		ATCC	
<i>Candida albicans</i>			10231
<i>Aspergillus</i>		Souche sauvage	
<i>Cladosporium</i>		Souche sauvage	

II.1- Recherche de l'activité antibactérienne

Un screening primaire a été réalisé afin d'apprécier les activités antimicrobiennes extracellulaires par la méthode des cylindres d'Agar suivi par un screening secondaire permettant la préparation et le test du composé brut et concentré.

II.1.1- Technique des cylindres d'agar et choix du milieu optimal pour les activités antimicrobiennes

L'activité antibactérienne du composé brut a été testée par la méthode des cylindres d'agar décrite ci-dessous :

La **ML9831** estensemencée sur milieu **KN** sans sel par écouvillon afin d'obtenir un tapis et l'incubation dure 72 heures (jusqu'à l'apparition des spores) à une température de 30°C.

La standardisation de l'inoculum des bactéries test est une étape importante pour la reproductibilité des tests. L'inoculum était préparé de la même façon que celui de l'antibiogramme réalisé par la technique du **CLSI (2010)**.

Des cylindres d'agar d'environ 6 mm de diamètre ont été prélevés à l'aide de l'extrémité plate d'une pipette Pasteur stérile à partir de la gélose **KN** sans sel, où la **ML9831** était ensemencée, puis, ces cylindres ont été déposés sur les boîtes de Pétri contenant une gélose Muller-Hinton préalablement ensemencée par les bactéries test.

Les boîtes ont été ensuite laissées pendant 2 heures à 4°C (pour permettre la diffusion des activités antimicrobiennes) puis incubées à la température adéquate pour chaque type des bactéries test pendant 24 heures. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés par suite (**Tortorano et al ., 1979 ;Hosny et al ., 2011**).

Deux autres milieux de culture autre que le milieu **KN** sans sel ont été utilisés et qui sont : la gélose nutritive et le milieu Mossel, ceci afin d'optimiser la biosynthèse des activités antimicrobiennes par la souche **ML9831**. Ces deux milieux ont été testés par la technique des cylindres d'agar citée ci-dessus.

II.1.2-Concentration et extraction des activités antimicrobiennes

II.1.2.1- Culture de l'isolat bactérien en milieu solide et choix du solvant

Afin de choisir le meilleur solvant d'extraction quatre solvants de polarité différente et qui sont : l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'éther et le chloroforme ont été utilisés.

L'isolat bactérien **ML9831** a été ensemencé sur la gélose nutritive durant 72 heures à 30°C. Après, le milieu a été découpé en petits cubes et mis dans des erlenmeyers contenant 40 ml de chaque solvant. L'extraction a été réalisée sous agitation pendant deux heures à température ambiante. L'extrait organique obtenu de chaque solvant a été filtré, puis évaporé à 45 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec de chaque solvant a été récupéré avec 5 ml du même solvant qui a servi à l'évaporation.

L'activité antibactérienne a été évaluée en utilisant des disques en papier (6 mm de diamètre) imbibés par 100 µl des différents extraits et déposés sur la gélose Muller-Hinton déjàensemencée par les bactéries test -dont l'inoculum était préparé de la même façon que celui de l'antibiogramme réalisé par la technique du **CLSI (2010)**- . Les boîtes ont été incubées à 4 °C pendant deux heures et plus tard à la température adéquate pour chaque type de bactéries test pendant 24 heures. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés par suite (**Ayari et al., 2012**).

II.1.2.2-Culture de l'isolat bactérien en milieu liquide

Dans cette technique, le surnageant et l'extrait concentré ont été préparés et soumis à un essai contre les bactéries test.

II.1.2.2.1-Préparation du surnageant de la ML9831

Le surnageant de la souche **ML9831** a été préparé selon le protocole de **Moshafi et al. (2006)**. La souche était cultivée dans 50 ml du bouillon nutritif durant 72 heures à 30 °C,

ensuite une centrifugation à 5000 tour pendant 10 min a été réalisée afin d'éliminer les cellules.

II.1.2.2.2-Préparation de l'extrait concentré de la ML9831

L'extrait concentré a été préparé en utilisant le protocole de **Chen et al.(2010)**. Une pré-culture a été réalisée en inoculant 20 ml du bouillon nutritif avec une culture bactérienne pendant 24 heures à 30°C sous agitation rotative à 180 tours par minute, ensuite, ce volume a été transféré dans 180 ml du bouillon nutritif et incubé à 30°C pendant 72 heures.

Une centrifugation a été réalisée (10.000 tour pendant 20 min), le liquide récupéré a été mélangé avec du chloroforme a un ration de 1 :1. Après une décantation, la solution organique a été séparée et évaporée à sec sous pression réduite à 45 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait sec a été ensuite repris avec 5 ml de chloroforme.

Les disques de papier d'environ 6 mm de diamètre reçoivent 100 µl de l'extrait chloroformique à tester et du surnageant. Après séchage, les disques ont été déposés sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Muller-Hinton ensemencée par les bactéries test-dont l'inoculum était préparé de la même façon que celui de l'antibiogramme réalisé par la technique du **CLSI (2010)** -. Les boîtes ont été laissées pendant 2 heures à 4°C puis incubées à la température adéquate pour chaque bactérie test pendant 24 heures. Les diamètres des zones d'inhibition seront mesurés.

II.2- Recherche de l'activité antifongique contre la levure et les moisissures

La levure utilisée dans est la souche *Candida albicans* ATCC 10231 ; multirésistante aux antifongiques.

Un inoculum équivalent à 0.5 Mc Farland est réalisé dans les mêmes conditions que celui des bactéries sauf que l'absorbance était comprise entre 0.12-0.15 à une longueur d'onde de 530 nm. L'ensemencement a été effectué par écouvillonnage sur gélose Sabouraud.

La recherche de l'activité antifongique de la **ML9831** vis-à-vis de *Candida albicans* était réalisée par la technique des cylindres d'agar et par la technique des disques imbibés par 100 µl de l'extrait chloroformique et par 100 µl du surnageant issue du bouillon nutritif de la même façon que celle décrite pour les bactéries sauf que la boîte était incubée à 37 °C pendant 20 à 24 heures. La lecture de la zone d'inhibition a été effectuée par suite (**Espinel-Inggroff, 2007**).

L'activité fongitoxique de la **ML9831** a été évaluée contre *Aspergillus* et *Cladosporium* par la technique d'empoisonnement de la nourriture (**Soliman et Badeaa, 2002**).

Une pré-culture a été réalisée ; sur une boîte de Pétri, contenant le Sabouraud solide, un disque a été déposé au centre de la boîte provenant d'une culture pure, l'incubation se fait durant 7 jours.

100 µl d'extrait chloroformique sont additionnés à 20 ml de milieu Sabouraud, les mélanges sont coulés sur des boîtes de Pétri. Après, un disque (6 mm de diamètre) du mycélium de la moisissure coupé de la périphérie de la pré-culture de 7 jours est déposé au centre des boîtes puis incubé à 25°C± 2 pendant 7 jours. La lecture est réalisée à partir du 3^{ème} jour en mesurant les diamètres des zones de croissance de l'hyphe par rapport au contrôle et le pourcentage d'inhibition mycélienne est calculé par la formule suivante :

$$T = \frac{Db - Da}{Db} \times 100$$

Avec :

T : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne en %.

Da : Le diamètre de la colonie mycélienne dans l'expérience (mm).

Db : Le diamètre de témoin (mm).

II.3-Essais de séparation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes produites par la **ML9831**

II.3.1-Chromatographie sur couche mince en gel de silice

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorptions ; la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progressent le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Six microlitres de l'extrait chloroformique sont déposés à l'aide d'une micropipette -sous forme de spot- à 01cm du bord inférieur des plaques de chromatographie sur couche mince (CCM) en aluminium (20 × 20 cm) préalablement étalées par une couche mince de gel de silice (Merck).

Ces plaques sont ensuite maintenues verticalement dans des cuves de CCM contenant 100 ml de solvant. Les systèmes de solvants qui ont été utilisés durant la manipulation sont :

-Chloroforme –méthanol (60/40)

-Acétate d'éthyle- méthanol (100 : 15, v / v)

-Chloroforme –méthanol –ammoniaque (8 : 1 : 1, v / v) (**Badji *et al.*, 2005**).

L'atmosphère des cuves est saturée pendant deux heures, avant d'y introduire les plaques. La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant atteint le bord supérieur de la plaque. Le solvant est éliminé de la plaque par une simple évaporation à température ambiante. Cette manipulation a été réalisée dans le laboratoire des produits naturels avec la collaboration du **Dr Baghdad C.**

II.3.2- Révélation chimiques des chromatogrammes

La révélation se fait à l'œil nu et en utilisant des révélateurs chimiques et qui sont :

-La ninhydrine : révélateur de la fonction amines

-Le réactif de Molish : révélateur des sucres

-Chlorure de fer -FeCl₃- : révélateur des fonctions phénols (voir **annexe n°5**).

Ensuite, le rapport frontal (R_f) de chaque tache a été calculé par la formule suivante :

$$R_f = \frac{\text{Distance de migration entre le dépôt et la tache}}{\text{Distance de migration entre le dépôt et le front du solvant}}$$

II.3.3- Etude spectroscopique de l'extrait chloroformique : absorption infra-rouge

La spectrométrie infrarouge recouvre plusieurs méthodes d'identification et de dosage non destructives basées sur l'absorption (ou la réflexion) par l'échantillon du rayonnement électromagnétique de longueur d'onde comprise entre 1 et 1000 mm. Le rayonnement électromagnétique interagit avec les niveaux d'énergie des molécules ; il induit, à la résonance, des transitions entre niveaux de vibrations. On peut en déduire des informations sur la nature des liaisons chimiques présentes dans un composé. Chaque type de liaison présente une absorption du rayonnement électromagnétique dans une bande de longueur d'onde relativement étroite. La spectrométrie infrarouge est donc une méthode d'identification. Elle est aussi employée comme méthode de dosage lorsque l'analyse quantitative est possible (**Rouessac et al ., 2004**).

Cette analyse a été réalisée au sein du laboratoire de chimie et de synthèse des composés organiques avec la collaboration du **Pr Mostapha-Kara B**. L'appareil utilisé est un spectrophotomètre du type Agilent Technologies Cary 600FTIR Spectrometer. Pour cette analyse, l'extrait chloroformique se présentait sous forme déshydraté, déposé et bien étalé sur la surface centrale du diamant à l'aide d'une spatule ensuite les mesures sont effectuées automatiquement toutes les deux minutes. Le nettoyage de la cellule après chaque mesure est effectué avec de l'éthanol.

Résultats et discussion

I – Résultats de l'identification phénotypique et génotypique de la souche nommée ML9831

I.1- Résultats de l'identification phénotypique de l'isolat

La souche nommée **ML9831** est un présumé *Bacillus* faisant partie de la collection du **Dr Khelil**, isolée depuis 1998 à partir du lac D'EL Goléa. De ce fait l'identification phénotypique de cet isolat a été réalisée en suivant les recommandations de **Logan al. (2009a)** pour la description de nouveaux taxons dans l'ordre des *Bacillales*.

I.1.1-Caractérisation morphologique de la souche

I.1.1.1-Aspect microscopique

La détermination de la morphologie, l'arrangement cellulaire, la mobilité ainsi que le Gram de la souche **ML9831** ont été réalisés sur des souches jeunes cultivées à 30°C sur milieu **KN** additionné de 10 % de NaCl, par contre la formation des corps sporaux a été observée sur des cultures âgées.

L'état frais de l'isolat **ML9831** montre qu'il se présente sous forme d'un petit bâtonnet régulier mobile. La coloration de Gram d'une culture jeune a révélé que l'isolat est Gram positif aux extrémités arrondies sans mode de regroupement précis tandis que la coloration au bleu de méthylène réalisée sur une culture âgée a démontré la formation de spores en position subterminale (**figure n°5**).

I.1.1.2-Aspect macroscopique

L'observation macroscopique de la souche après 6 jours sur le milieu **KN** avec 10 % de NaCl cultivée à 30°C, a permis de dégager des colonies de forme irrégulière bombée et lisse avec un aspect visqueux et de couleur beige comme le montre la **figure n°6**.

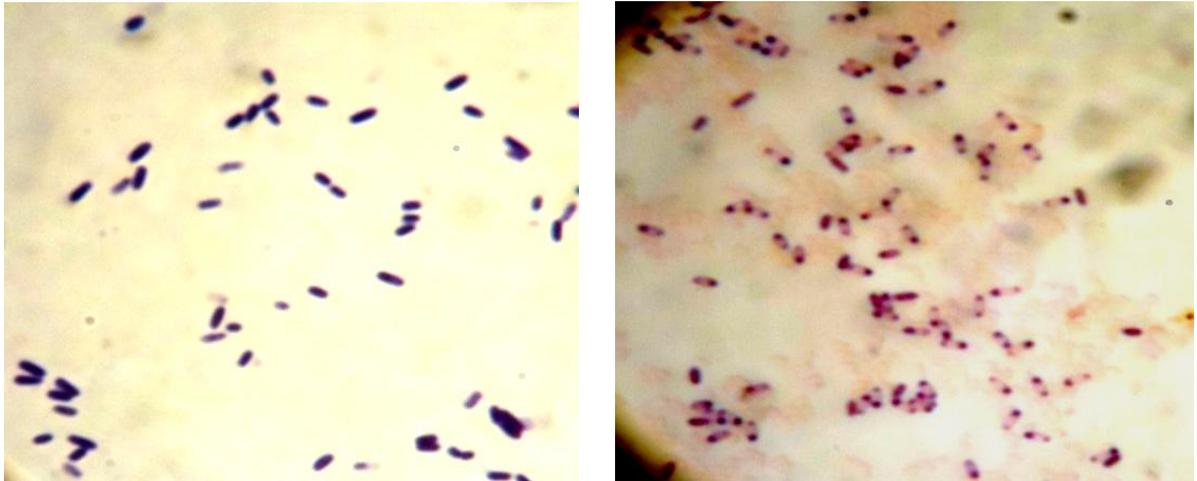


Figure n°5 : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). .A droite : culture bactérienne âgée formant des spores ; à gauche : culture jeune révélant la couleur violette des Gram positifs. Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Cyber shot DSCW530 (Zoom x4).

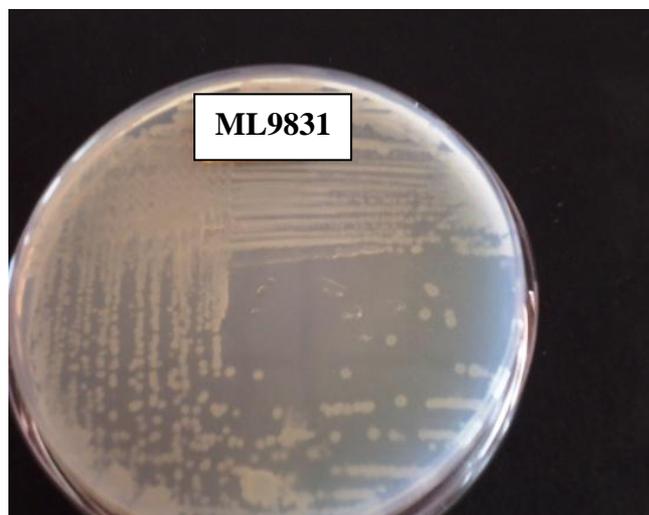


Figure n°6 : Aspect macroscopique des colonies sur le milieu **KN** solide additionné de 10% de NaCl. Photo prise avec un appareil photo numérique Sony Ericsson Cyber-shot DSCW530 (zoom x1)

I.1.2- Caractérisation physiologique

I.1.2.1- Influence de la concentration en NaCl

La gamme de salinité qui a été explorée varie de 0 à 30 % (p/v). L'optimum de croissance était de 7.5% (p/v). La croissance de la **ML9831** sur milieu de culture **KN** dépourvu de sel a été observée ce qui peut la qualifier selon **Kushner (1993)** d'halotolérante. Une croissance (mais faible) a été observée entre 10 à 15%. En revanche, aucune croissance n'a été observée à 30% (p/v) comme le montre la **figure n°7**.

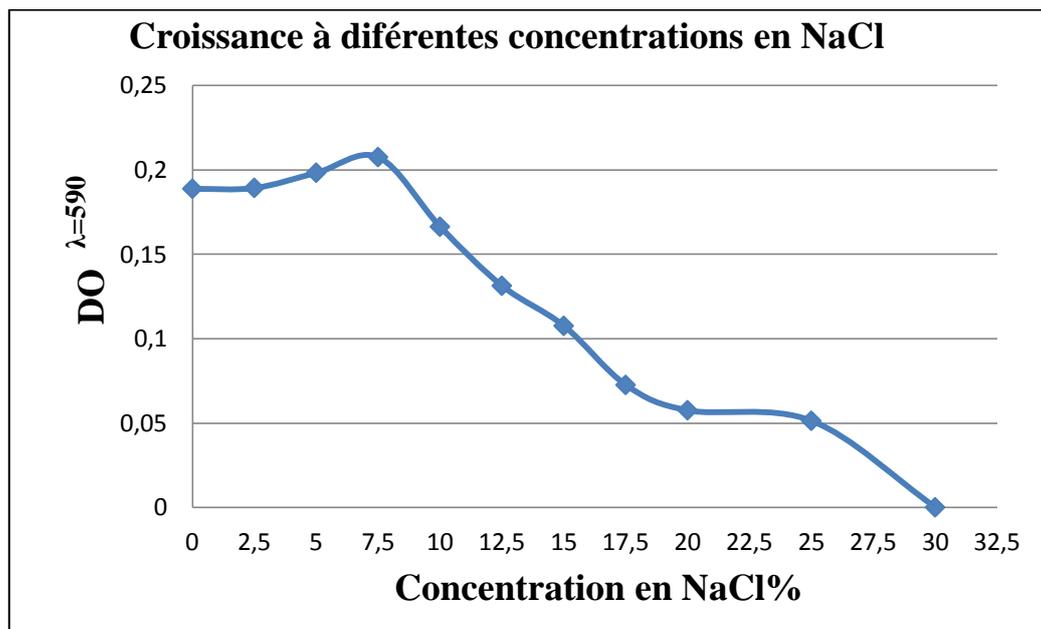


Figure n°7 : Cinétique de croissance de la **ML9831** à plusieurs concentrations en NaCl.

I.1.2.2- Effet du pH

Selon la **figure n°8**, l'intervalle de pH permettant la croissance de l'isolat bactérien variait entre 6 et 9 avec un optimum de croissance de 7. C'est donc une bactérie neutrophile mais qui peut être qualifiée également d'alcalotolérante. L'halotolérante et l'alcalotolérance sont souvent conjuguées et il a été prouvé que l'alcalo-résistance voire même l'alcalophilie exigeait la présence intracellulaires d'ions de sodium pour le métabolisme et la régulation,

c'est la raison pour laquelle que la plupart des bactéries alcalophiles sont au moins halotolérantes (Lewinson *et al.*, 2004).

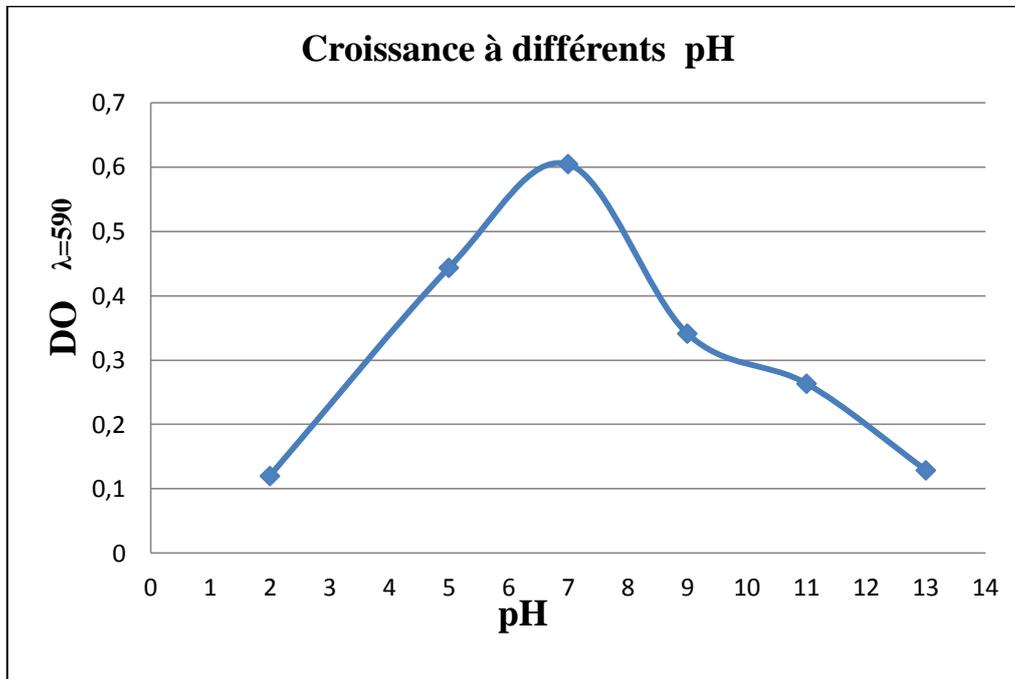


Figure n°8 : Cinétique de croissance de la **ML9831** à plusieurs pH

1.1.2.3- Température optimale de croissance

En ce qui concerne la croissance à plusieurs températures, la gamme exploitée était de 4 à 55°C. La cinétique de croissance est représentée par la **figure n°9** et révèle que l'intervalle de température permettant la croissance de la **ML9831** est de 25 à 37°C avec un optimum de 30°C, ce qui nous mène à dire que la souche est mésophile. Le graphe révèle aussi une survie observée dans l'intervalle 37 à 40°C. Il s'agit donc de souche mésophile légèrement thermotolérante.

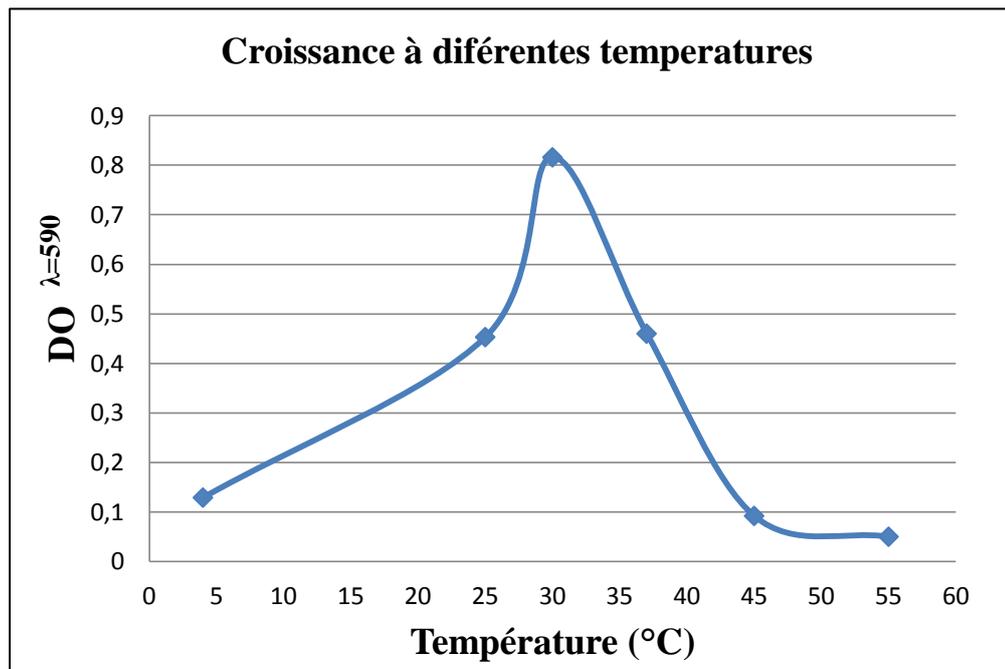


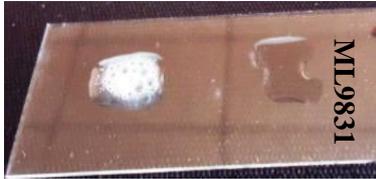
Figure n°9 : Cinétique de croissance de la **ML9831** à plusieurs températures.

I.1.3- Caractérisation biochimique

I.1.3.1-Mise en évidence des enzymes respiratoires

Les résultats de la mise en évidence des enzymes respiratoires ont montré que la **ML9831** possède une catalase, une cytochrome oxydase et est aéro- anaérobie facultative. Une réduction du nitrate en nitrites sans production de gaz a été observée.

Sur le milieu mannitol- mobilité, la fermentation du mannitol a été observée grâce au virage de l'indicateur vers le jaune orangé. La diffusion dans la gélose a eu lieu confirmant ainsi la mobilité de l'isolat comme le montre la **figure n°10 (Joffin et Leyral, 2006)**.



Test de la Catalase : Formation de bulles de gaz

ML9831



Test de l'Oxydase : Apparition d'une couleur violette



Type respiratoire



Test du mannitol- mobilité



Test de la nitrate réductase

Figure n ° 10 : Résultats de la mise en évidence des enzymes respiratoires et le test Mannitol- mobilité de la **ML9831**. Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Cyber shot DSCW530 (Zoom x1).

I.1.3.2-Plaques API 20E

Les autres tests biochimiques ont été réalisés en utilisant la plaque **API 20 E**. Les résultats sont mentionnés dans le **tableau n°9** et montrent que la **ML9831** possède une β -galactosidase, enzyme responsable de la dégradation du lactose, une Arginine dihydrolase et peut utiliser le citrate comme unique source de carbone et d'énergie. Cependant, elle est déficiente en lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase, uréase et ne produit pas d'indole.

Le tableau révèle aussi que l'isolat liquéfie la gélatine et est incapable d'utiliser tous les sucres présents au niveau de la plaque **API 20 E**. La production d' H_2S n'était pas observée.

Tableau n° 9 : Résultats de la plaque API 20E de la ML9831.

Tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP
	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : Positif - : Négatif N.D : Non Déterminé



Figure n°11 : Résultat de la plaque API 20 E de la ML9831.

Photo prise avec un appareil photo numérique Sony Cyber shot DSC-W530 (Zoom x1).

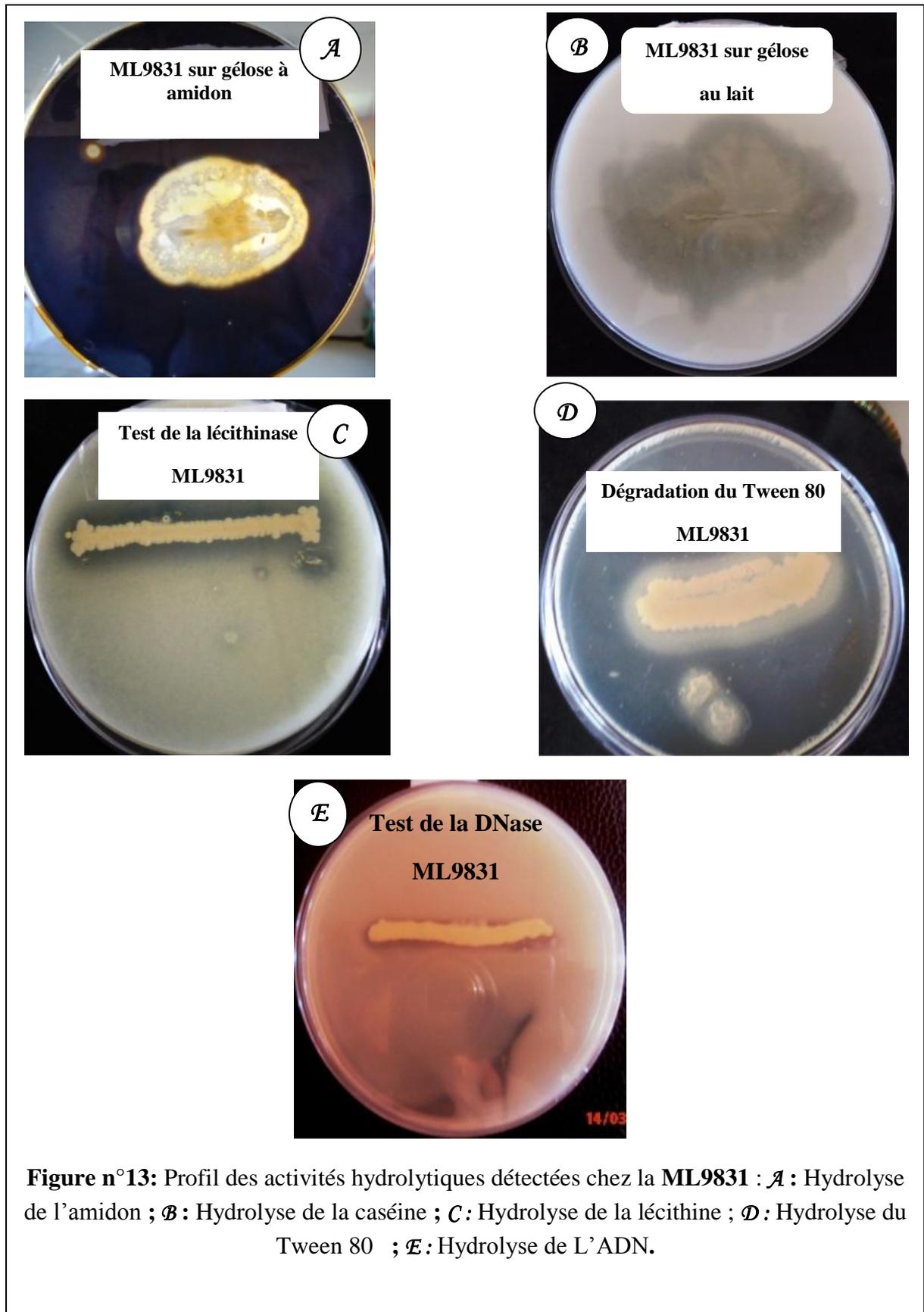
1.1.3.3-Dégradation de l'esculine

La capacité à dégrader l'esculine est observée chez la **ML9831**. En effet, un précipité noirâtre a été aperçu dû à la réaction de l'esculétine avec les ions Fe^{+3} comme le montre la **figure n°12**. Ce qui confirme la présence de l'enzyme esculinase chez cet isolat bactérien.



1.1.3.4-Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

Un screening des activités amylolytiques, protéolytiques, lipolytiques ainsi que la dégradation de l'ADN a été effectué. La présence de ces activités a été détectée en utilisant les substrats suivants : amidon, caséine, Tween 80, gélose à la lécithine et gélose à ADN. Le profil de l'activité hydrolytiques extracellulaires de la **ML9831** a montré que la souche a hydrolysé l'amidon, l'esculine, la caséine, l'ADN, le Tween 80 et possède aussi une lécithinase comme le montre la **figure n°13**.



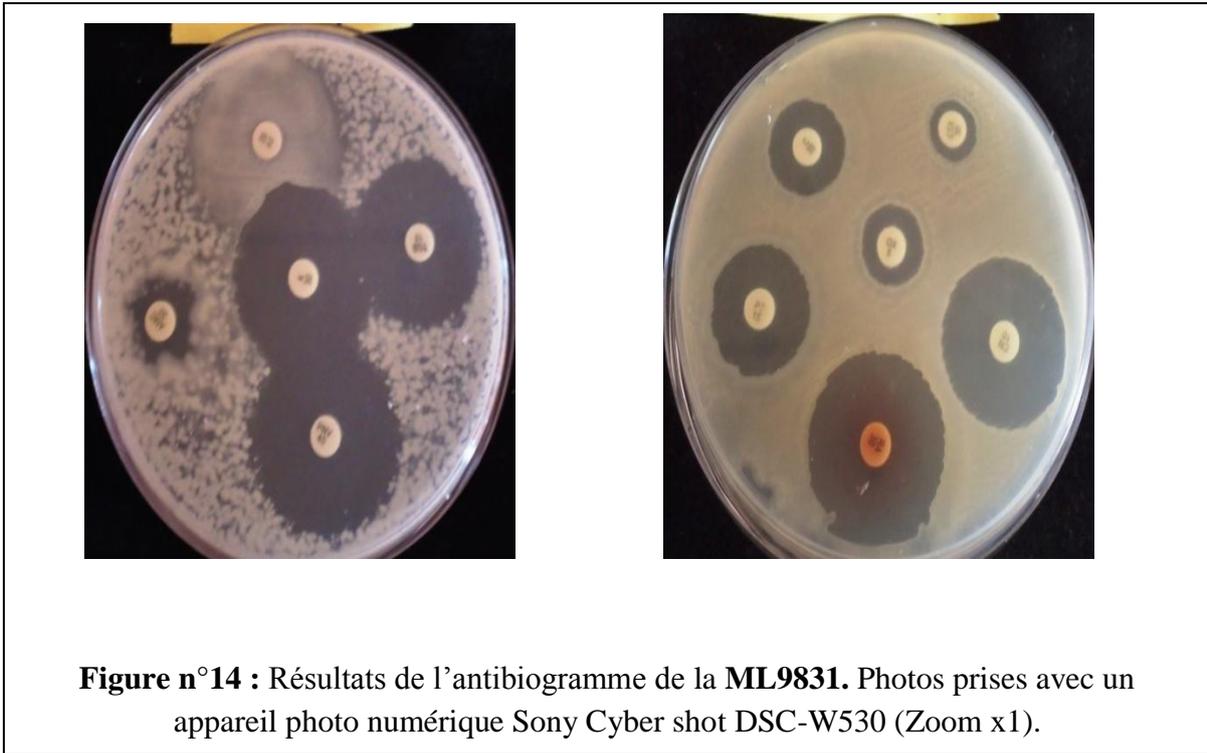
I.1.4- Sensibilité aux antibiotiques

Le résultat de l'antibiogramme -réalisé par la technique des disques -est indiqué dans le **tableau n°10** ci-dessous. La **ML9831** présente une résistance au Cefotaxime et est intermédiaire au Chloramphénicol. En revanche la souche reste sensible à l'association Amoxicilline-acide clavulanique, à la Pénicilline/novoboïcine et à l'Oxacilline.

Concernant les aminosides, la bactérie est sensible à la Gentamicine, à la Tobramycine et à la Kanamycine. Cependant, un phénomène de synergie était observé entre la Kanamycine et la Fosfomycine surtout que la souche exprimait une résistance hétérogène vis-à-vis ce dernier antibiotique. Une excellente activité est enregistrée pour la Rifampine et pour la Pristinamycine avec des diamètres d'inhibition importants.

Tableau n° 10 : Résultats de l'antibiogramme de la ML9831.

Antibiotiques	Diamètre de la zone d'inhibition (cm)	Interprétation
Amoxicilline/acide clavulanique	1.7	Sensible
Pénicilline/novoïcine	2.9	Sensible
Oxacilline	1.5	Sensible
Cefotaxime	1	Résistante
Gentamicine	2.5	Sensible
Kanamycine	2.8	Sensible
Tobramycine	2.6	Sensible
Pristinamycine	2	Sensible
Rifampine	2.7	Sensible
Fosfomycine	3	Résistance hétérogène
Chloramphénicol	1.6	Intermédiaire



I.2- Résultats de l'identification génotypique de la **ML9831** : *Phylogénie de la souche*

Une séquence de bases du gène codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomal a été alignée avec les séquences représentatives des différents phylums du domaine des *Bacteria*, indiquant l'appartenance de la souche **ML9831** à la famille des *Bacillaceae* avec **96%** de similitude.

Au seuil de cet ordre, la souche **ML9831** est proche de *Filobacillus milosensis* (Schlesner *et al* ., 2001) et de *Bacillus haloalkaliphilum* (Fritze,1996) avec **95 %** de similitude comme le montre la **figure n° 15** .

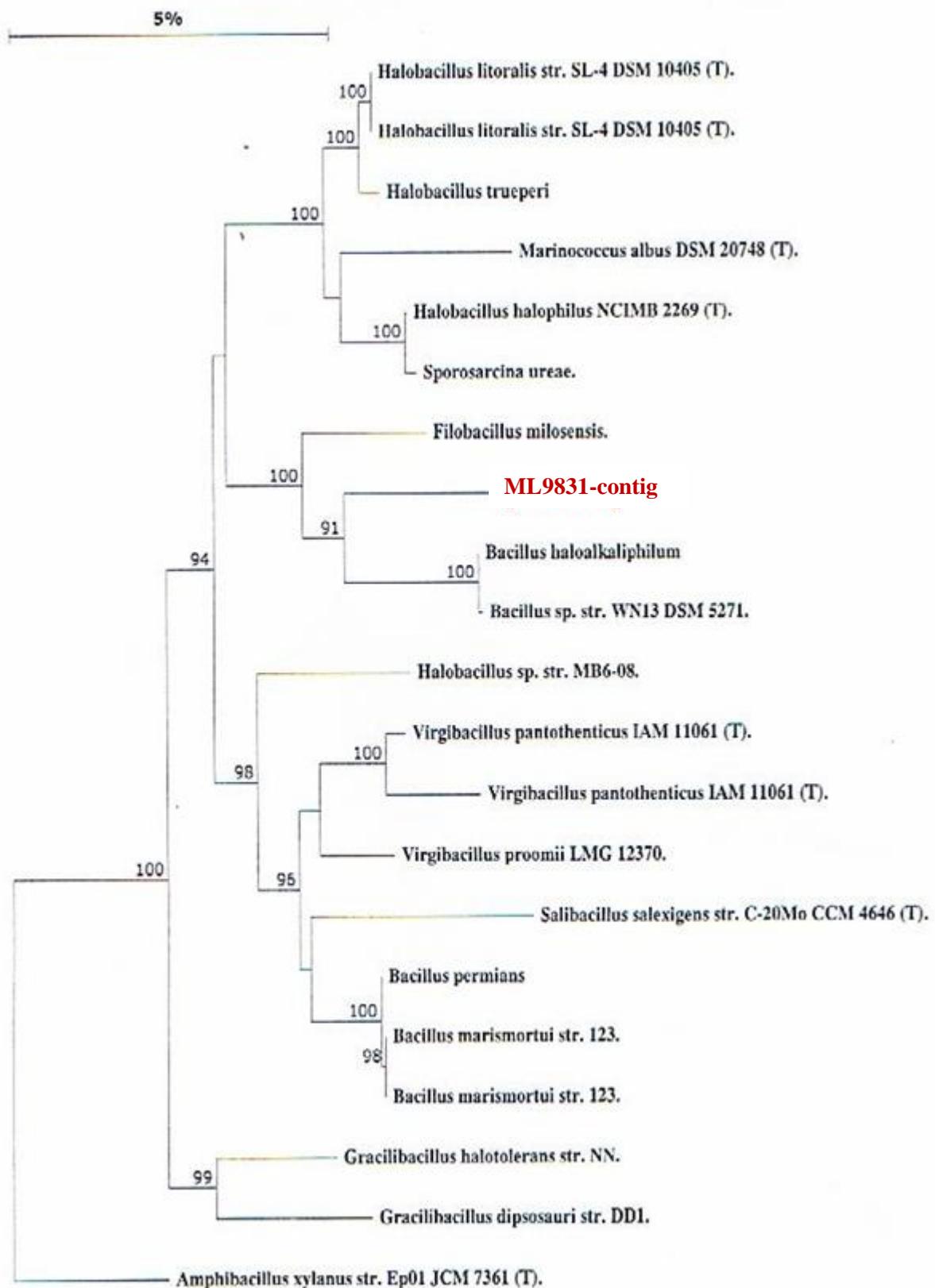


Figure n°15: Position phylogénique de la souche **ML9831** au sein de l'ordre des *Bacillales*.

I.3- Discussion

Cette présente étude avait comme premier objectif la caractérisation d'une souche nommée **ML9831** qui provient de la sebkha d'El Goléa.

Ces dernières années, les études relevant, à des degrés divers, du concept de biodiversité de la microflore halophile et halotolérantes se sont multipliées. La caractérisation est aussi motivée par l'acquisition de connaissances sur leur écologie.

Le lac d'EL Goléa est situé au milieu du Sahara Algérien et peut être considéré comme un environnement *athalassohalin* car l'hypersalinité découle de la dissolution des sels d'origine continentale (**Rodriguez-Valera, 1993**). En plus de la salinité et de l'emplacement géographique, le facteur de pollution s'ajout, exerçant ainsi une forte pression de sélection naturelle de souches particulières relativement inexploitées renfermant des propriétés biotechnologiques très intéressantes (**Hacène et al., 2004 ; Boutaiba et al., 2011**).

Selon les travaux du Dr **Khelil Klouche (1998)**, cette souche appartiendrait au genre *Bacillus*. De ce fait, toute la caractérisation phénotypique à savoir l'analyse de la morphologie et la détermination de certains caractères physiologiques et biochimiques ainsi que la sensibilité aux antibiotiques ont été orientées vers celles qui caractérisent ce genre selon les recommandations de **Logan et al. (2009a)**.

Les résultats de la caractérisation morphologique montrent que la bactérie nommée **ML9831** est un bâtonnet court à Gram positif aux extrémités arrondies, mobile, formant des endospores subterminales non déformantes, caractéristiques du genre *Bacillus*. La bactérie forme des colonies non pigmentées sur milieu **KN** additionné de 10% de NaCl ; ce qui est en général un trait majeur des bactéries halophiles et halotolérantes (**Bouchotroch et al., 2001 ; Arahal et al., 2002**).

Cette souche possède des caractéristiques morphologiques et culturelles très particulières notamment la forme, la viscosité et l'absence de la pigmentation des colonies, ainsi que la capacité à croître dans un milieu contenant 10% de NaCl. En l'occurrence, cette souche est sans doute nouvelle. Technique certifiant son originalité est une analyse génotypique afin de savoir la position taxonomique exacte de cette souche d'une part et de confirmer la nouveauté du taxon d'autre part.

Nous rappelons la technique utilisée pour déterminer le rang taxonomique de la **ML9831** : la séquence nucléotidique de la sous unité 16S a été alignée avec celles des bactéries de référence obtenues à partir de Genbank et l'EMBL appartenant à l'ordre des *Bacillales*.

Les résultats de cet alignement montrent que la souche nommée **ML9831** appartient au domaine des *Bacteria* ordre des *Bacillales*, famille des *Bacillaceae* avec **96 %** de similitude.

Comme le montre l'arbre phylogénique réalisé par le **Dr Jean Luc Cayol**, la souche **ML9831** est proche de *Filobacillus milosensis* avec un pourcentage de similitude de **95 %** qui a été isolé au niveau de la plage de Palaeochori à proximité d'une zone de ventilation profonde des eaux hydrothermales à Milos en Grèce par **Schlesner et al. (2001)** et du *Bacillus haloalkaliphilum* avec un pourcentage de similitude de **95 %**, isolé en **1985** au niveau du lac du Wadi Natroun en Egypte et caractérisé en **1996** par **Fritze**.

La souche **ML9831** diffère de *Filobacillus milosensis* par des caractéristiques phénotypiques telles que l'oxydase, les enzymes extracellulaires hydrolytiques. Par contre, elle est quasi identique phénotypiquement à *Bacillus haloalkaliphilum* sauf par sa capacité à réduire le nitrate en nitrite et au niveau de l'hydrolyse de l'esculine qui n'est pas déterminée chez cette dernière. Les traits de similitudes et de divergences sont illustrés dans le **tableau n°11**.

Le contenu en guanine et cytosine de l'ADN génomique de cette souche est en cours de réalisation et qui va compléter cette étude et fera l'objet d'une publication dans le future.

Tableau n° 11 : Caractéristiques différentielles entre la souche **ML9831** et les deux autres espèces appartenant à l'ordre des *Bacillales*.

Caractéristiques	ML9831	<i>Filobacillus milosensis</i>	<i>Bacillus haloalkaliphilum</i>
Morphologie	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet
Mobilité	+	+	+
Catalase	+	+	+
Oxydase	+	-	+
Gamme de NaCl %(p/v)	0-30%	2-23%	0-25%
Optimum %(p/v)	7.5%	8-14%	nd
Gamme de pH	2-13	6.5-8.9	-
Optimum	7	7.3-7.8	9.7
Gamme de température (°C)	4-55°C	33-42°C	nd
Optimum (°C)	30	33 -38 °C	nd
Hydrolyse de :			
Gélatine	+	-	+
Amidon	+	-	W
Esculine	+	-	-
Caséine	+	-	+/-
Tween 80	+	nd	-
DNas	+	+	nd
Réduction du nitrate	+	+	-
Production d'acide du :			
D-glucose	-	-	-
D-galactose	-	-	nd

D-fructose	-	-	nd
Maltose	-	-	nd
Mannitol	+	-	nd
Sucrose	-	-	nd
Trehalose	-	-	-
D-xylose	nd	-	-
Sensibilité aux antibiotiques			
Ampicillin	S	S	nd
Chloramphenicol	I	S	nd
Streptomycin	nd	S	nd
Tetracycline	nd	S	nd
Kanamycin	S	R	nd
Contenu en G+C (mol %)	ER	35	37–38

+ : Positif - : Négatif n.d : Non Déterminé W : Une semaine S : sensible I : intermédiaire R : résistante
ER : encours de réalisation

La caractérisation physiologique de la **ML9831** a permis de détecter une croissance de 0 à 25% (p/v) de NaCl avec un optimum de 7.5%. Selon **Kushner (1993)**, la souche peut être classée dans la catégorie des bactéries halotolérantes car elle pousse dans un milieu exempt de NaCl. Mais, vu sa capacité à croître dans des milieux où la concentration en NaCl est supérieure à 20% (p/v), cette souche est classée dans la catégorie des bactéries halotolérantes extrêmes selon la définition de **Tiqula et al. (2006)**. Par contre, aucune croissance n'a été détectée à 30% (p/v) de NaCl. En effet, la plupart des espèces bactériennes connues sont des halophiles modérées ou des halotolérantes. A l'heure actuelle, uniquement trois espèces bactériennes ont été décrites comme des aérobies halophiles extrêmes et qui sont *Halovibrio denitrificans*, *Halospina denitrificans* (**Sorokin et al., 2006**) et *Salicola marasensis* (**Maturrano et al., 2006b**).

Ces résultats sont surprenant, car en général, les bactéries sont halophiles ou halotolérantes modérées plutôt qu'extrêmes, car ce caractère est attribué aux archées et non pas aux bactéries (**Oren, 2002**).

La croissance à plusieurs températures a montré que la **ML9831** croit dans un intervalle de 25 à 40°C avec un optimum de 30°C. Ces résultats nous ont permis de la qualifier comme étant une bactérie mésophile à légèrement thermotolérante. Cette thermotolérance peut s'expliquer par la situation géographique du lac d'EL Goléa ; vu que la majorité des environnements hypersalins sont localisés en régions arides et semi arides (**Itoh et al., 2005**).

L'optimum de croissance de la **ML9831** à différents pH était de 7,0, ce qui la classe dans la catégorie des neutrophiles. Mais, une croissance légère a été décelée jusqu'à pH égale à 9,0 ; ce qui la qualifie de bactérie neutrophile à légèrement alcalotolérante. Cette tolérance à l'alcalinité peut être expliquée selon **Lewinson et al. (2004)** par la conjugaison de ce caractère à l'halotolérance puisque l'alcalo-résistance voire même l'alcalophilie exigeait la présence intracellulaires d'ions de sodium pour le métabolisme et la régulation. En même temps, le lac d'EL Goléa a un pH alcalin selon les résultats de l'analyses physicochimiques réalisés par **Boutaiba et al. (2011)**.

En somme, les résultats de la caractérisation physiologique révèlent que la souche nommée **ML9831** est halotolérante extrême, mésophile à légèrement thermotolérante et neutrophile à légèrement alcalotolérante.

Les tests biochimiques réalisés sur cette bactérie montrent la présence d'une cytochrome oxydase et d'une catalase. Généralement, c'est le cas de la majorité des bactéries aérobies membres de la famille des *Bacillaceae* (**Oren, 2002**). Le test du mannitol mobilité a confirmé la mobilité de la souche et la fermentation du mannitol.

Les autres tests biochimiques ont été réalisés grâce à la plaque **API 20 E**. Ce système est largement utilisé dans les méthodes d'identification pour les membres du genre *Bacillus* et apparenté. Des études réalisées ont montré que la meilleure reproductibilité des tests pourrait

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

Ce système a révélé que la souche n'utilise pas les sucres présent dans cette plaque et il n'y a pas eu de production d'indole ce qui est fréquent chez ce type de microorganismes (**Chen et al., 2008; Peng et al., 2009**).

Concernant l'hydrolyse des polymères testés, ces tests de mise en évidence ne donnent pas une appréciation quantitative de l'activité enzymatique. Mais sur une vue d'ensemble de production d'enzymes, et en recensant les activités enzymatiques produites à 30°C, la souche **ML9831** est dotée d'activités protéolytiques et amylolytique. Quant aux autres activités, elles sont moins intenses.

En effet, les bactéries halotolérantes ont développé des stratégies diverses pour survivre aux conditions extrêmes. Pour l'utilisation des substrats naturels, comme l'amidon par exemple, de nombreuses bactéries halotolérantes possèdent cette activité amylolytique et dont l'enzyme responsable a été identifiée comme étant une amyloglucosidase. De nombreuses études de caractérisation des amylases des bactéries *Bacillus* halotolérantes et halophiles ont montré que ces enzymes sont souvent stables et restent actives à des températures au-dessus de 50°C, sur un large intervalle de pH et aux fortes salinités (jusqu'à 30%, p/v) (**Prakash et al., 2009**).

Quand aux protéases issues des *Bacillus*, elles sont l'une des enzymes les plus largement étudiées et sont largement appliquées dans les processus industriels comme additives, dans les détergents à lessive, la transformation des aliments, dans des produits pharmaceutiques et les réactifs de diagnostic (**Karbalaei-Heidari et al., 2009**). Elles ont été isolées et caractérisées à partir de plusieurs bactéries halotolérantes y compris les espèces du genre *Bacillus sp.* (**Setyorini et al., 2006**), ces enzymes présentent une activité optimale en présence de 3% à 25% (p/v) de NaCl, sur un intervalle de pH de 5 à 10 et aux températures comprises entre 40 et 75°C (**Vidyasagar et al., 2009**).

L'activité lipolytique a été détectée chez la **ML9831** est relativement faible par comparaison avec celles des activités amylolytique et protéolytique. De nombreux travaux ont permis d'isoler des bactéries halotolérantes et halophiles d'environnements hypersalins possédant des lipases actives en présence de fortes concentrations salines (**Rohban et al., 2009**) ; ce qui n'est pas vraiment le cas pour la **ML9831**.

Ces lipases bactériennes sont essentiellement extracellulaires, où le plus grand facteur dans l'expression de cette activité a toujours été l'exigence d'une source de carbone appropriée. L'utilisation d'acides gras fournit des esters hydrolysables qui induisent l'activité lipolytique chez la bactérie. Les lipases sont produites durant la croissance bactérienne et qui peut varier de quelques heures à plusieurs jours selon les bactéries et les conditions environnementales (**Gupta et al., 2004**).

L'isolat bactérien **ML9831** possède aussi une DNase. Ce résultat est en accord avec les travaux de **Sánchez-Porro et al. (2002)** ; où ils ont conclu que les bactéries modérément halophiles et halotolérantes à Gram positif ont plus d'activités hydrolytiques, spécialement en ce qui concerne la production d'enzymes DNase. En effet, les potentielles biotechnologiques des bactéries halotolérantes et halophiles n'ont pas été largement exploités surtout quant il

s'agit des nucléases, seuls quelques enzymes ont été caractérisées comme la nucléase synthétisée par *Bacillus sp.* lors des travaux d'**Onishi et al. (1983)**.

La combinaison de ces activités hydrolytiques chez cet isolat bactérien est très importante de point de vue biotechnologique. De nombreuses études réalisées sur des habitats hypersalins géographiquement séparés ont signalé de telle combinaison chez les halophiles et que les bactéries à Gram positifs possèdent plus d'activités hydrolytiques envers les polymères testés (**Rohban et al., 2009**).

Ce bagage enzymatique est directement influencé par la disponibilité des nutriments dans l'environnement direct, et fait partie de l'adaptation de ces microorganismes à leur milieu naturel. Autre point important, il semble qu'une plus grande adaptabilité de certaines

souches aux conditions de température, de pH et de salinité a une relation avec la capacité de ces mêmes souches à produire des enzymes extracellulaires : une plus grande capacité d'adaptation implique des mécanismes métaboliques plus développés, comparativement aux microorganismes qui en sont dépourvus (**Cohen, 2011**).

En ce qui concerne le profil de la sensibilité aux antibiotiques, les résultats de l'antibiogramme montrent une sensibilité à la plupart des antibiotiques testés, ce qui est en corrélation avec les études qui ont été consacrées à la sensibilité des bactéries du genre *Bacillus* aux agents antimicrobiens malgré leurs nombres restreints. L'exception est faite pour le Chloramphénicol où ce genre demeure sensible à cet antibiotique ,ce qui n'est pas le cas pour la **ML9831**, puis ce qu'elle était intermédiaire. Cela peut s'expliquer par la diminution de la perméabilité (**Euzéby, 2008**).

La résistance observée chez la **ML9831** vis-à-vis de la Cefotaxime peut être expliquée par la production du genre *Bacillus* aux bêtalactamases à spectre étendus qui hydrolysent toutes les bêtalactamines jusqu' aux céphalosporines de 3^{ème} génération. Elles sont plasmidiques, transférables et sensibles aux inhibiteurs des bêtalactamases. En effet, les résultats de **Coonrod et al. (1971)** ont rapporté que le Chloramphénicol, la Kanamycine et la Gentamicine avaient un pouvoir inhibiteur contre les souches du genre *Bacillus* indépendamment d'espèces. Mais, il y avait une nette différence de sensibilité liées aux espèces, vis-à-vis de la Pénicilline G, à la Méthicilline, et aux céphalosporines, et cela est dû à la production des β -lactamases à large spectre (**Andrews et Wise, 2002**).

Les données de nombreuses études concernant de nouveaux isolats du genre *Bacillus* isolés à partir des environnements Antarctique ont montré une sensibilité à plusieurs antibiotiques notamment à l'Ampicilline, au Chloramphénicol et à la Kanamycine (**Logan et al., 2000 ; 2002b**)

Nous pouvons conclure à la lumière des résultats de l'analyse phylogénique et vu le pourcentage de similitude inférieur à **97%** que la souche **ML9831** est un nouveau genre, nouvelle espèce, jamais séquencée jusqu'à ce jour là. Les différences des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques de cette souche comparées avec *Bacillus*

haloalkaliphilum et *Filobacillus milosensis* illustrées dans le **tableau n°11** ne font que confirmer notre caractérisation.

II-Résultats de la pré-caractérisation des activités antimicrobiennes produites par la souche ML9831

Bien que le nombre des composés antimicrobiens obtenu par voie naturelle, notamment à partir des microorganismes ne cesse d'augmenter, il n'y a qu'une faible proportion de ces molécules qui peuvent aboutir à des applications. Les molécules bioactives actuellement disponibles sur le marché ont été obtenus après des décennies de dépistage intensif et de recherche (**Donadio et al ., 2002**).

Les sebkhas constituent un environnement extrême abritant des microorganismes qui survivent à des salinités très élevées, à de hautes températures et résistent à de graves radiations solaires, et qui sont frénétiquement explorées pour dépister leur potentiel producteur de nouvelles molécules bioactives (**Motta et al ., 2004**).

Afin de mettre en évidence les activités antimicrobiennes par la souche **ML9831**, différentes techniques ont été utilisées.

II.1- Recherche de l'activité antibactérienne

Le choix des souches test dépend du but spécifique de la recherche .Les souches de référence sensibles aux antibiotiques sont de préférence employées, diverses combinaisons sont possibles, mais un panneau devrait au moins se composer d'une bactérie à Gram positif et une autre à Gram négatif (**Cos et al ., 2006**).

Sur cette base, le choix des souches bactériennes pour la réalisation de ces tests antimicrobiens a été fait de façon à obtenir un représentant de chaque classe. Des souches du genre *Bacillus* ont été utilisées afin d'apprécier l'effet antagoniste de la **ML9831** vis-à-vis de ces bactéries de référence.

Il faut noter aussi que les souches *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont servi comme modèle de référence dans plusieurs études préliminaires afin d'évaluer

l'activité antibactérienne de nombreuses bactéries et d'actinomycètes productrices de composés bioactifs (**Kamat et al ., 2011 ; Reghioua et al ., 2008**).

II.1.1- Résultats de la technique des cylindres d'agar et choix du milieu optimal pour les activités antimicrobiennes

Le screening primaire de la production des activités antimicrobiennes extracellulaires et le choix du meilleur milieu de production ont été réalisés par la technique des cylindres d'agar.

Cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé qui permet de détecter l'effet inhibiteur de la **ML9831** envers des bactéries test. Le développement d'un germe test, ensemencé dans la gélose, permet après incubation, de déceler la présence d'une substance inhibitrice qui est matérialisée par une zone translucide au niveau de la zone de diffusion du composé antimicrobien, alors que partout ailleurs, le développement du microorganisme est visible.

Plusieurs études ont montré que la nature de la source de carbone, d'azote et de la source minérale des milieux de culture influence énormément sur la capacité à produire des activités antimicrobiennes. Pour cette raison, deux milieux de culture- autre que le milieu **KN** conçu exempt de sel – et qui sont : la gélose nutritive et le milieu Mossel ont été utilisés afin de choisir le meilleur milieu de production des antimicrobiens. Les résultats de cette technique sont exprimés dans le tableau n° 12.

Les résultats montrent que la **ML9831** possède un pouvoir inhibiteur contre toutes les souches bactériennes à Gram positif, le plus grand diamètre étant de 15 mm contre *Staphylococcus aureus* et de 14 mm contre *Listeria monocytogenes*. Par contre, elle est active seulement contre *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre de 12.5 mm. L'activité inhibitrice contre les autres bactéries à Gram négatif n'était pas observée. Ces résultats ont été obtenus à partir des cylindres d'agar prélevés de la gélose nutritive comme le montre le tableau n° 12.

Les milieux de culture **KN** exempt de sel et **Mossel** ont donné des zones d'inhibitions moins importantes comparées avec ceux obtenus à partir de la gélose nutritive. L'activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif était conservée, la plus grande zone d'inhibition était contre *Listeria monocytogenes*, contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. Pour les bactéries à Gram négatif, la seule activité observée était contre *Pseudomonas aeruginosa*. Ces résultats ont été retrouvés pour ces deux milieux.

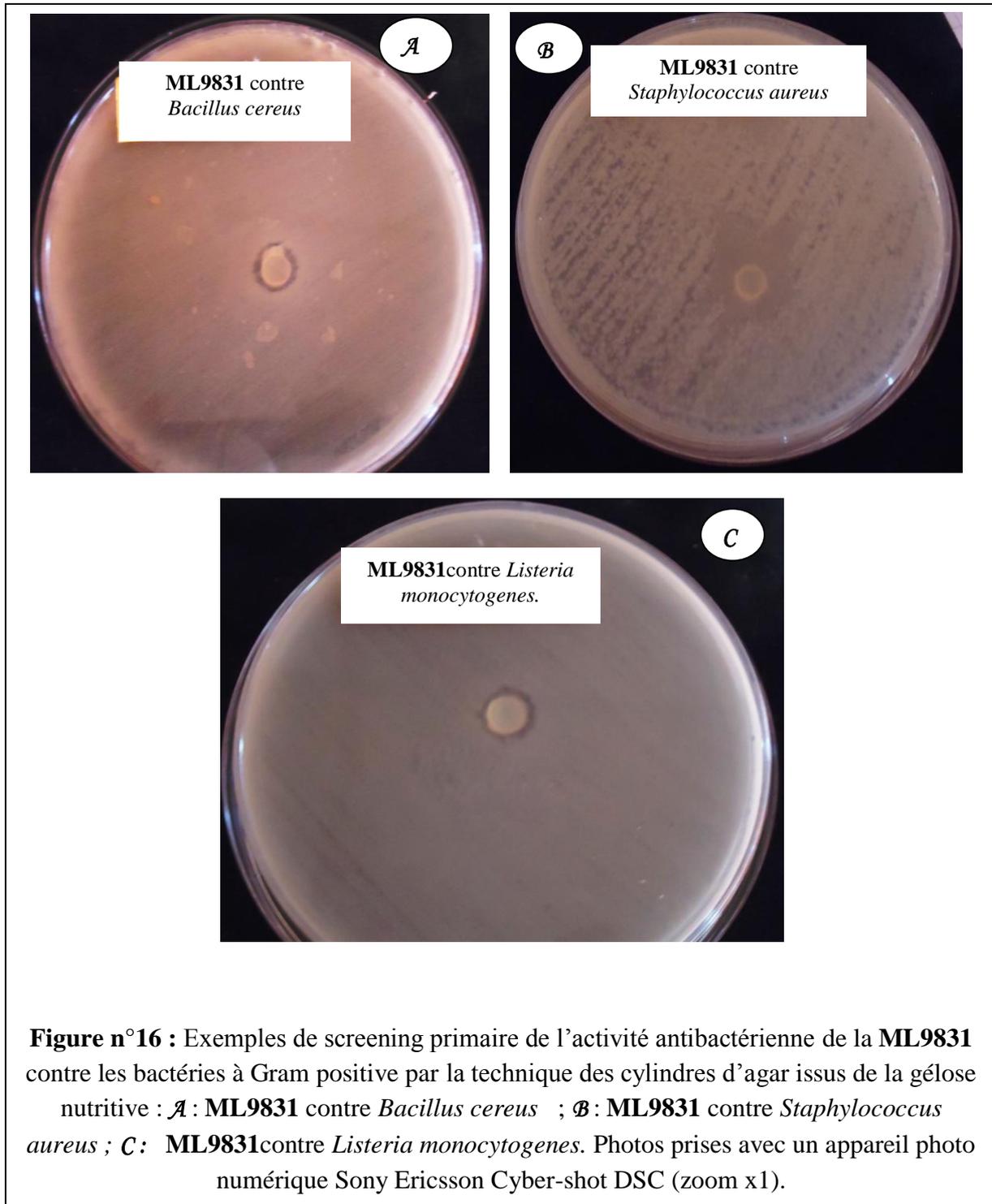
Sur la base de ces résultats, le tableau fait ressortir la gélose nutritive comme le bon milieu de production puisque elle a donné les meilleures zones d'inhibition par rapport à celles du milieu **KN** exempt de sel et du milieu Mossel.

En effet, l'ensemble des facteurs nutritionnels et environnementaux influençant la production des substances antimicrobiennes permettent de mettre en évidence certains traits majeurs, car il a été admis que la synthèse intervient quand la croissance se trouve limitée par l'un des substrats du milieu et les facteurs qui interviennent sont : la source de carbone, l'azote et le phosphate (**Cheng et al ., 1995**).

Tableau n° 12 : Résultats de l'activité antibactérienne de la **ML9831** par la technique des cylindres d'agar.

Souche	Diamètres de la zone d'inhibition exprimés en mm		
	Gélose nutritive	Milieu de culture KN sans sel	Milieu Mossel
<i>Enterococcus faecalis</i>	9	7	7
<i>E. coli</i>	/	/	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	/	/	/
<i>Acinetobacter baumannii</i>	/	/	/
<i>Salmonella enteritidis</i>	/	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	10	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12.5	9	8.5

<i>Bacillus cereus</i>	11	10	10
<i>Bacillus subtilis</i>	8	7	8
<i>Listeria monocytogenes</i>	14	12	11



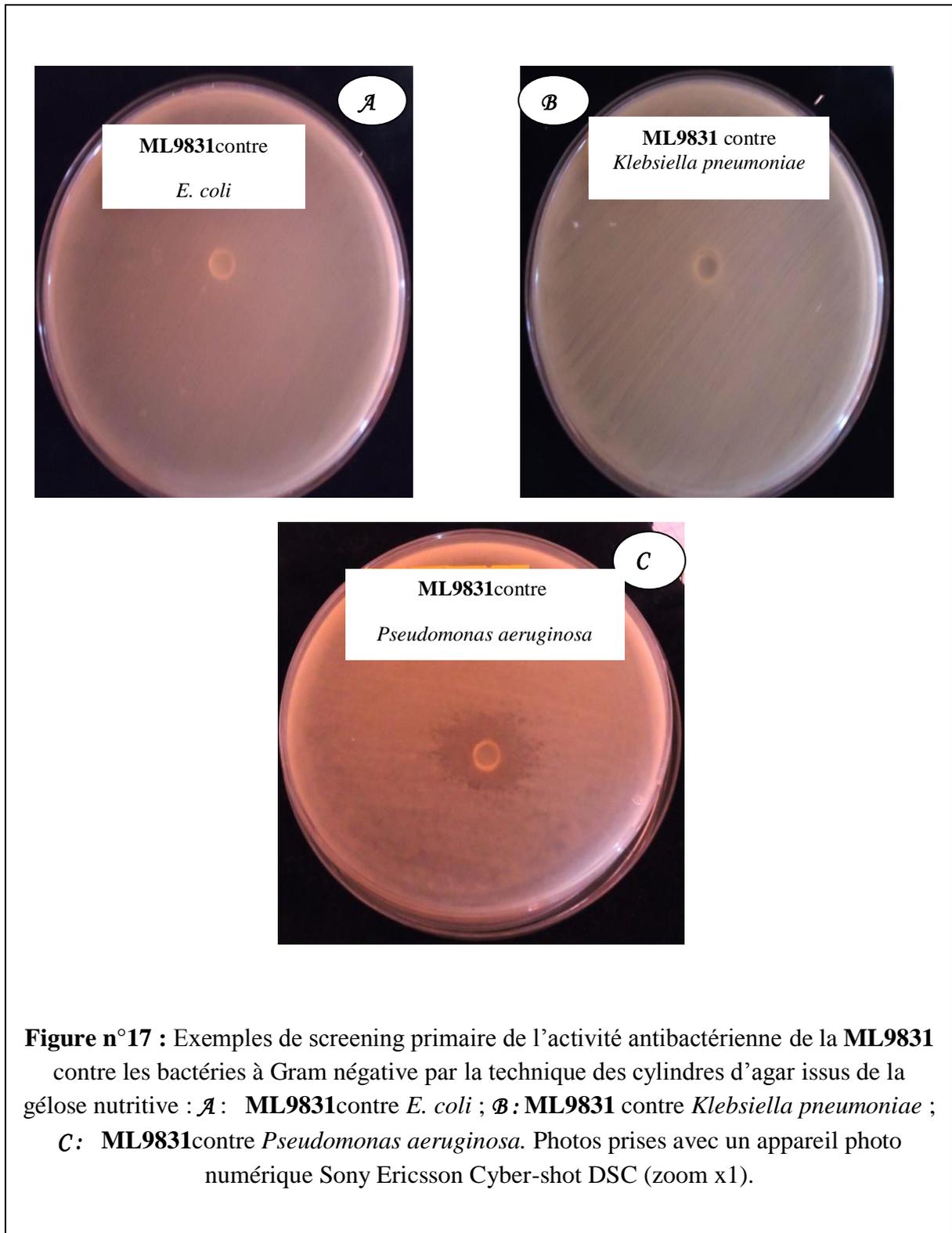


Figure n°17 : Exemples de screening primaire de l'activité antibactérienne de la **ML9831** contre les bactéries à Gram négative par la technique des cylindres d'agar issus de la gélose nutritive : **A** : **ML9831** contre *E. coli* ; **B** : **ML9831** contre *Klebsiella pneumoniae* ; **C** : **ML9831** contre *Pseudomonas aeruginosa*. Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Ericsson Cyber-shot DSC (zoom x1).

II.1.2-Résultats de la concentration et extraction des activités antimicrobiennes

Une fois les activités antimicrobiennes ont été confirmées, la recherche s'est dirigée vers l'extraction par deux techniques : à partir du milieu gélosé afin de choisir le meilleur solvant d'extraction ensuite à partir du milieu liquide. Les résultats de ces deux techniques sont mentionnés ci-dessous.

II.1.2.1- Résultats de la culture de l'isolat bactérien ML9831 en milieu solide et choix du solvant

Quatre solvants (acétate d'éthyle, méthanol, éther et chloroforme) ont été utilisés pour l'extraction à partir de la gélose nutritiveensemencée préalablement par la souche **ML9831**. Le test d'activité contre les bactéries test a été réalisé par la technique des disques en papier de 6 mm de diamètre -en raison de 100µl de chaque extrait/ disque-. Les résultats sont représentés dans le **tableau n ° 13**.

Tableau n ° 13 : Résultats de l'activité antibactérienne de la **ML9831** en milieu solide et choix du solvant.

Souche	Diamètres de la zone d'inhibition des différents extraits exprimés en mm			
	EM	EAE	EC	EE
<i>Enterococcus faecalis</i>	/	10	11	/
<i>E. coli</i>	/	9	11	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	/	9	10	/
<i>Acinetobacter baumannii</i>	/	/	9	/
<i>Salmonella enteritidis</i>	/	9	9	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.5	10	12	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.5	9	11.5	/
<i>Bacillus cereus</i>	/	12	10	/
<i>Bacillus subtilis</i>	/	9	12	/

EM : extrait méthanolique, EAE : extrait d'acétate d'éthyle, EC : extrait chloroformique, EE : extrait d'éther

Selon le tableau, l'extrait d'éther n'a donné aucune activité contre les bactéries test. Les diamètres des zones d'inhibition des disques imprégnés par l'extrait méthanolique ont donné une légère activité de 6.5 mm contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

L'extrait d'acétate d'éthyle a donné une activité contre les bactéries à Gram positif, contre les bactéries à Gram négatif utilisées à l'exception d'*Acinetobacter baumannii*. Par contre, l'extrait chloroformique a donné une activité contre toutes les bactéries test utilisées, les plus grands diamètres de zones étaient de 12 mm obtenus contre les bactéries à Gram positif à savoir *S.aureus* et *B. subtilis*.

Etant donné que les diamètres des zones d'inhibition de l'extrait chloroformique sont plus importants que ceux de l'extrait d'acétate d'éthyle, le solvant de choix pour extraire les activités antimicrobiennes extracellulaires de la **ML9831** est le chloroforme.

II.1.3.2- Résultats de la culture de l'isolat bactérien ML9831 en milieu liquide

Cette technique a donné des résultats très importants, les diamètres des zones d'inhibition sont mentionnés dans le **tableau n ° 14**.

Le surnageant a donné une activité négligeable contre les bactéries à Gram positif par contre aucune activité n'a été détectée contre les bactéries à Gram négatif. Cela est peut être dû à la faible concentration des activités antimicrobiennes dans ce dernier (**Reghioua et al ., 2008**).

En ce qui concerne l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique issue du bouillon nutritif, les plus grands diamètres de zones d'inhibition ont été obtenus à partir des disques ayant une charge de 100 ul contre *B.subtilis* et *S.aureus* où ils mesuraient 23 mm et 18 mm respectivement (voir **figure n°18**).

D'après le **tableau n° 14**, une activité a été décelée contre *Pseudomonas aeruginosa* et *E.coli* où les diamètres de la zone d'inhibition étaient de 14 mm et 13 mm respectivement, et contre *K.pneumoniae*, *E. faecalis* et *Bacillus cereus* où les deux diamètres de la zone d'inhibition étaient de 12 mm.

Pour *Salmonella enteritidis* et *Acinetobacter baumannii*, les diamètres de zones d'inhibition étaient de 10 mm.

En comparant les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique issu de ces deux techniques de screening secondaire, on peut conclure que l'activité sur milieu liquide est meilleure que sur milieu solide.

Tableau n° 14 : Résultats de l'activité antibactérienne de la **ML9831** en milieu liquide.

Souche	Diamètres de la zone d'inhibition exprimés en mm
<i>Enterococcus faecalis</i>	12
<i>E. coli</i>	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10
<i>Salmonella enteritidis</i>	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
<i>Bacillus cereus</i>	12
<i>Bacillus subtilis</i>	23



Figure n°18 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique -issu du bouillon nutritif -de la **ML9831** contre les bactéries à Gram positif .Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Ericsson Cyber-shot DSC (zoom x1).

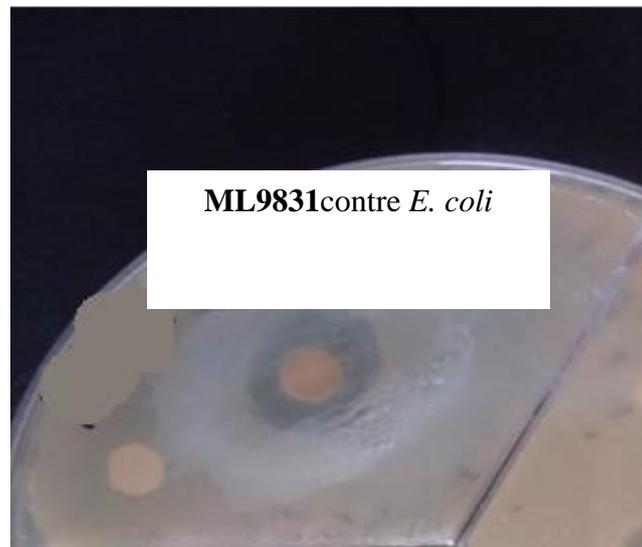
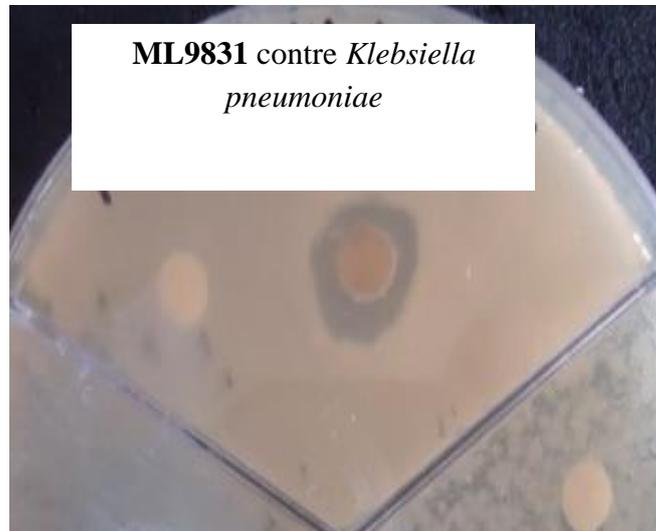


Figure n°19 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique -issu du bouillon nutritif -de la **ML9831** contre les bactéries à Gram négatif .Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Ericsson Cyber-shot DSC (zoom x1).

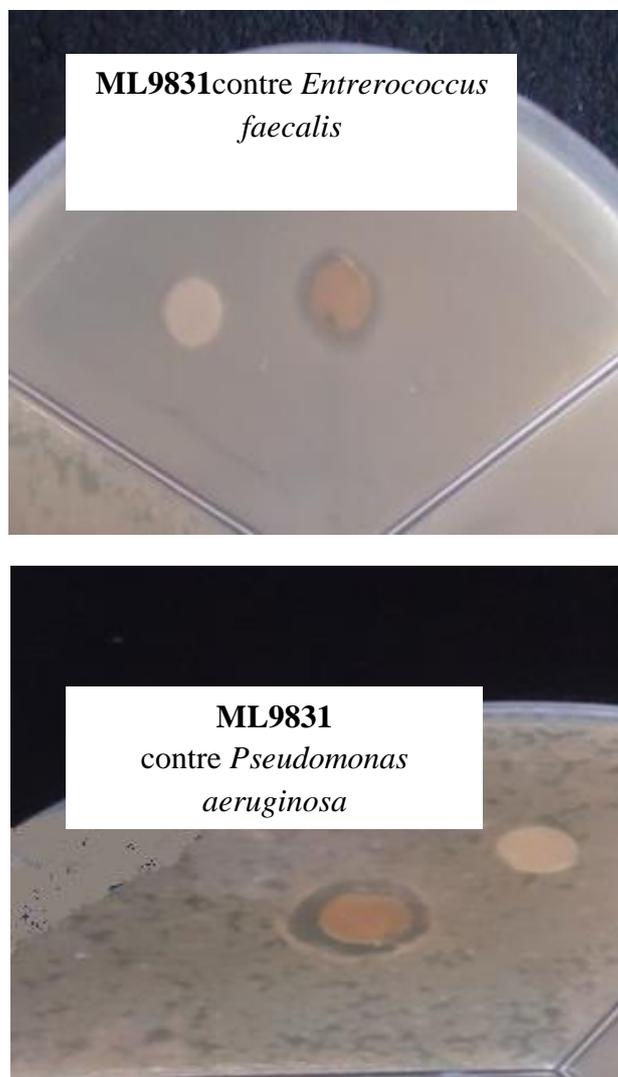


Figure n°20 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique-issu du bouillon nutritif - de la **ML9831** contre les bactéries test .Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Ericsson Cyber-shot DSC (zoom x1).

II.2- Recherche de l'activité antifongique

Le choix des souches fongiques est une étape importante dans l'étude d'un criblage antifongique. Ce choix doit être porté en premier temps sur des souches de référence sensibles. Vu la non disponibilité de ces souches au niveau de notre laboratoire, nous nous sommes intéressées à une levure multirésistante *C.albicans* ATCC 10231 afin de mener les tests d'une part et aux deux moisissures sauvages *Aspergillus* et *Cladosporium* d'autre part.

Aucun résultat n'a été détecté contre *C.albicans* ATCC 10231 par la technique des cylindres d'agar.

Les résultats précédents ne nous ont pas empêché de réaliser le screening secondaire. L'évaluation de l'activité antifongique est illustrée dans le **tableau n°15**. Pour *C.albicans* ATCC10231, l'activité a été réalisée par la technique des disques de papier imbibés par l'extrait chloroformique et du surnageant de la **ML9831** issue du bouillon nutritif, tandis que celle des moisissures été réalisée par la technique d'empoisonnement de la nourriture.

Selon le tableau,le surnageant n'a donné aucune activité contre *C.albicans* et un léger pouvoir inhibiteur a été décelé grâce à l'extrait chloroformique dont le diamètre de la zone d'inhibition été de 08 mm, et aucun pouvoir n'a été décelé . Cela peut être du au caractère multirésistant de cette levure.

La meilleure activité de l'extrait chloroformique issue du bouillon nutritif de la **ML9831** a été obtenue contre *Cladosporium spp* avec un taux d'inhibition dépassant les 50% et aucun pouvoir n'a été remarqué contre *Aspergillus*.

Tableau n° 15 : Résultats de l'activité antifongique de la ML9831.

Souches fongiques	Diamètres de zone d'inhibition (mm)		Pourcentages de zones d'inhibition
	EC	Surnageant	
Levure			
<i>C.albicans ATCC 10231</i>	08	/	/
Moisissures			
<i>Cladosporium (souche sauvage)</i>	/	/	52.94%
<i>Aspergillus (souche sauvage)</i>	/	/	0%

EC : extrait chloroformique

II.3-Résultats de l'essai de séparation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes produites par la ML9831

II.3.1-Chromatographie sur couche mince en gel de silice

Le **tableau n° 16** représente les résultats de la chromatographie sur couche mince en gel de silice de l'extrait chloroformique issue du bouillon nutritif de la souche **ML9831**.

La constante de migration caractéristique de chaque espèce chimique dans un système de phase stationnaire / phase mobile donnée est appelé le rapport frontal (R_f). Par définition, le rapport frontal est égal au rapport entre la distance parcourue par la tâche et la distance parcourue par le front du solvant depuis la ligne de dépôt.

D'après les résultats mentionnés dans le **tableau n°16**, le système solvant Chloroforme /Méthanol/Ammoniaque est le meilleur système permettant une migration rapide des molécules antimicrobiennes. Une grande partie des séparations par chromatographie sur couche mince fait appel au processus d'adsorption.

Une seule tache de couleur brune vue à l'œil nu est apparue sur la plaque, comme le montre la **figure n°21**, son R_f est de **0.91**. Cette tache révélée est constituée soit d'un seul type de molécule ou bien un ensemble de molécules ayant le même poids moléculaire et donc la même vitesse de migration.

II.3.2- Révélation chimique des chromatogrammes

Les tests de réactions chromogéniques effectués sont positifs pour le $FeCl_3$. réactif pour la révélation des composés phénoliques - et pour la ninhydrine- réactif pour la révélation des composés aminés- et négatifs pour le réactif de Mollish révélateur des sucres.

Tableau n° 16 : Résultats de la chromatographie sur couche mince de l'extrait chloroformique et des rapports frontaux des spots révélés.

Les révélateurs chromogéniques	Les systèmes solvants		
	C.M	AE.M	C.M.A
Ninhydrine	-	-	0.91
Aspect des spots	Tache brune à l'œil nu et rose après révélation		
Révélateur de Mollish	-	-	-
Aspect des spots			
$FeCl_3$	-	-	0.91
Aspect des spots	Tache brune à l'œil nu et marron foncé après révélation		

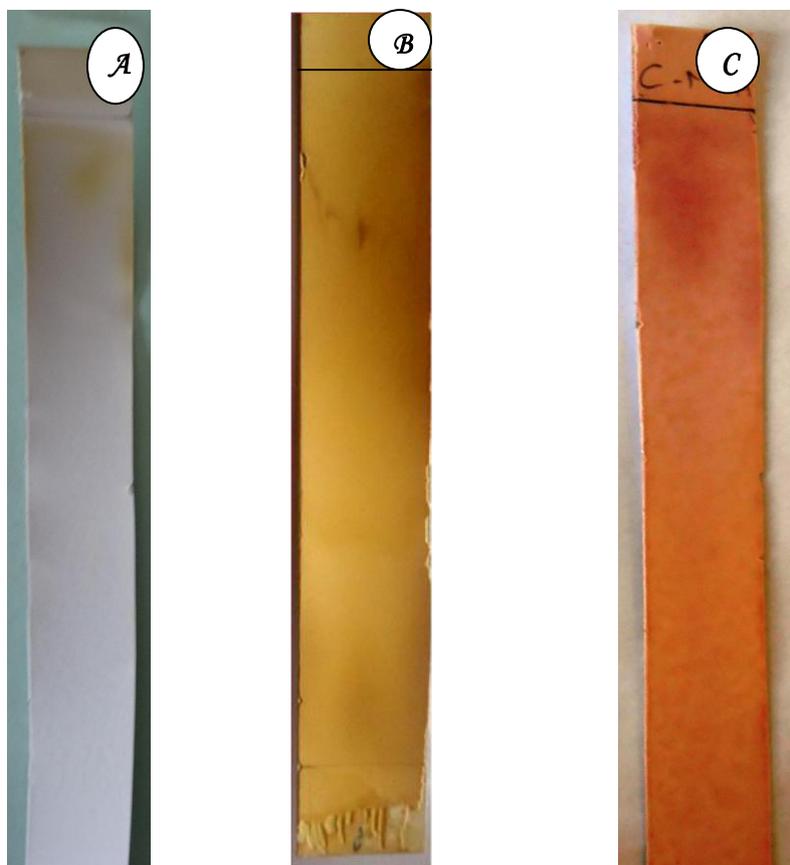


Figure n°21 : Résultats de la chromatographie sur couche mince de gel de silice de l'extrait chloroformique de la **ML9831**. **A** : vue à l'œil nu ; **B** : révélation avec le FeCl_3 ; **C** : révélation avec la ninhydrine. Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Ericsson Cyber-shot DSC (zoom x1).

II.3.3- Etude spectroscopique de l'extrait chloroformique : absorption infra-rouge

Une analyse spectrale de notre extrait chloroformique -sous forme déshydraté- a été réalisée. Le spectre obtenu est illustré dans la **figure n°22**.

Le graphe montre la présence des pics caractéristiques qui ont été comparés avec le tableau de corrélation mentionné dans l'**annexe n°7** correspondant à une bande d'absorption de 2928 à 3000 cm^{-1} qui correspond à des groupements N-H (amines) et phénols et une autre bande d'absorption de 1727.2777 cm^{-1} soit C=O N-H c'est-à-dire des groupements amides, ce qui confirme les révélations chimiques de la chromatographie sur couche mince.

Autres pics ont pu être détectés au niveau de la bande d'absorption de 1272.429 cm^{-1} qui correspond à des groupements amines toujours ou bien à des acides, et au niveau de la bande d'absorption de 1460.618 cm^{-1} qui correspond à des groupements phénols, des acides ou bien à des dérivés nitrés. Mais vu la non disponibilité des réactifs chimiques, qui peuvent être utilisés lors de la CCM, d'autres analyses sont nécessaires.

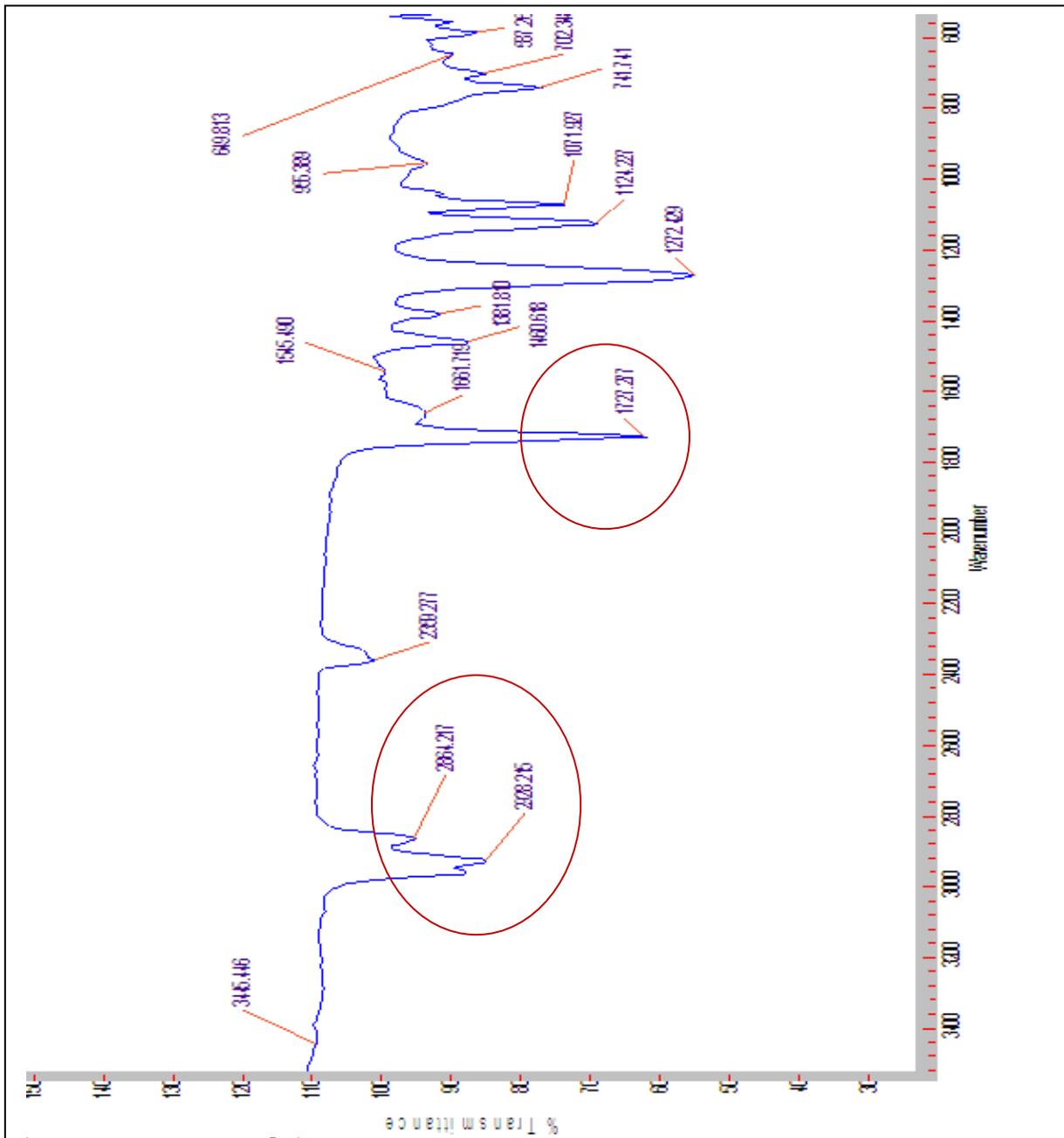


Figure n°22 : Spectre infra-rouge de l'extrait chloroformique déshydraté de la **ML9831.**

II.4- Discussion

Le criblage a toujours été la voie essentielle pour parvenir à de nouvelles molécules antimicrobiennes. Bien que son rendement se soit réduit au cours des dernières années, néanmoins, il est pratiqué jusqu'à ce jour par de nombreux laboratoires. Ceux-ci se sont efforcés de diversifier les sources de microorganismes en faisant appel à des échantillons provenant des habitats les plus exotiques et en mettant au point des méthodes de sélection qui favorisent des espèces rares.

Les bactéries du genre *Bacillus* sont connues pour produire des composés antimicrobiens. Cependant, peu de rapports sont disponibles et connus au sujet des bactéries halotolérantes, issues des milieux hypersalins, utilisées comme agents antimicrobiens (**Chen et al ., 2010**).

Afin de mettre en évidence les activités antimicrobiennes de la souche nommée **ML9831**, différents milieux et techniques ont été utilisés.

La technique des cylindres d'agar montre que la **ML9831** exerce un pouvoir inhibiteur plus important contre les bactéries à Gram positif en particulier *Listeria monocytogenes* (12 mm de diamètre), *Staphylococcus aureus* (10 mm de diamètre) et *Bacillus cereus* (10 mm de diamètre). Par contre, pour les bactéries à Gram négatif, le seul pouvoir inhibiteur était remarqué vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* (09 mm de diamètre). Ces résultats ont été obtenus avec des cylindres d'agar prélevés à partir du milieu **KN** exempt de NaCl.

La technique des cylindres d'agar nous a permis de choisir le bon milieu de production des activités antimicrobiennes extracellulaires produites par la **ML9831**. Étant donné que les conditions optimales de production des agents antimicrobiens ne sont pas nécessairement identiques à celles permettant une bonne croissance. Et comme les besoins nutritionnels et les conditions de culture ne sont pas les mêmes pendant la phase de croissance et celle de la production des métabolites (**Chen et al ., 2010**). De ce fait, deux autres milieux ont été utilisés et qui sont : la gélose nutritive et le milieu Mossel.

Les résultats de cette activité montrent que les cylindres d'agar prélevés à partir de la gélose nutritive ont donné des diamètres d'inhibition pouvant atteindre jusqu'à 15 mm pour le *Staphylococcus aureus* et 14 mm pour *Listeria monocytogenes*. Pour les bactéries à Gram négatif, le seul pouvoir inhibiteur était remarqué contre *Pseudomonas aeruginosa* dont le diamètre de la zone d'inhibition était de 12.5 mm. Ces résultats sont surprenants si on les compare avec ceux des cylindres d'agar prélevés à partir du milieu Mossel ou bien du milieu **KN** exempt de NaCl.

Donc on peut conclure que la gélose nutritive est le meilleur milieu de production de ces activités chez la **ML9831** car, elle permet une sporulation rapide de la bactérie (72 heures) contrairement aux deux autres milieux. Nos résultats correspondent avec les travaux de l'équipe d'**Awais (2008)** sur *B.pumilus*, où ils ont montré que l'inhibition maximale contre *S. aureus* était remarquée après 48 à 72 heures d'incubation. En effet, la synthèse des composés antimicrobiens par le genre *Bacillus* se fait en général au début de la phase de sporulation (**Awais et al ., 2007**).

Cette résistances aux agents antimicrobiens remarquée chez des bactéries test à Gram négatif peut être expliquée par la présence de la double paroi chez ces dernières (**Pelaez et al., 1998**). En plus, l'utilisation intensive des antibiotiques a provoqué une augmentation inquiétante de la multirésistance des bactéries pathogènes et l'émergence de nouveaux pathogènes. Les entérobactéries du groupe KES ont longtemps été considérées comme commensales, rarement pathogènes. L'emploi intensif des antibiotiques a entraîné la sélection de souches multirésistantes de *Klebsiella pneumoniae*. Ces espèces sont devenues des pathogènes opportunistes que l'on isole d'infections urinaires et pulmonaires, de pus, de septicémies, avec une fréquence croissante en milieu hospitalier (**Le Minor et Véron, 1990**).

Autre suggestion plausible est que la concentration des activités antimicrobiennes dans les cylindres d'agar est faible, car cette technique ne représente qu'un screening primaire. Ce qui nous a mené à faire un début de screening secondaire afin de concentrer ces activités.

En effet, une batterie de solvants organiques de polarités différentes et qui sont : le méthanol, l'éther, l'acétate d'éthyle et le chloroforme, ont été utilisés. Et comme milieu de

production, la gélose nutritive était choisie, du fait qu'elle ait donné de bons résultats d'antibiose comparés avec ceux du milieu **KN** exempt de sel et de la gélose Mossel lors du screening primaire.

Les résultats de l'extraction et la concentration des activités antimicrobiennes extracellulaires élaborées par la **ML9831** à partir du milieu solide révèlent que le chloroforme est le solvant de choix pour l'extraction, puisque il a donné une activité contre les bactéries à Gram positif et contre les toutes bactéries à Gram négatif, ce qui n'était pas le cas lors du screening primaire en utilisant la technique des cylindres d'agar. De plus, les diamètres de zones d'inhibitions étaient supérieurs si on les compare avec ceux obtenus à partir de l'extrait d'acétate d'éthyle. En revanche, aucune activité n'a été détectée à partir de l'extrait étherique.

Le chloroforme est un solvant de polarité intermédiaire. La polarité de chaque solvant est mesurée par sa constante diélectrique (voir **annexe n°6**). Les données chimiques nous permettent de conclure que la souche **ML9831** ne produit pas des molécules antimicrobiennes apolaires mais des molécules de polarité intermédiaire.

Le choix du solvant est en accord avec certains travaux qui indiquent que le criblage primaire des activités antimicrobiennes doit être initié par des extraits polaires suivi par des solvants moins polaires (**Cowan ,1999**).

La production et la concentration des activités antimicrobiennes à partir de milieu solide avaient pour objectif de choisir le meilleur solvant. Une autre technique d'extraction a été réalisée mais cette fois ci en utilisant le bouillon nutritif comme milieu de production et le chloroforme comme solvant d'extraction, car la répartition des nutriments dans les milieux liquides varie avec le temps de fermentation alors que leur distribution autour des colonies poussant sur les milieux solides ne varie pas ou varie très peu (**Iwai et Omura, 1982**).

La production par la **ML9831** sur milieu liquide a donné une excellente activité décelée par la technique des disques en papier en utilisant le bouillon nutritif comme substrat de production après extraction avec le chloroforme.

Cette technique a fait ressortir le pouvoir inhibiteur de notre isolat bactérien contre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. En effet les plus grands diamètres de zones d'inhibition ont été obtenus contre *B. subtilis* et *S. aureus*, où ils mesuraient 23 et 18 mm respectivement. Ces résultats correspondent avec ceux de l'étude réalisée par **Jaruchoktaweechai et al. (2000)** où le *Bacillus* sp. Sc026 isolé montre une activité contre *B. subtilis* et *S. aureus* avec des zones d'inhibition entre 8-28 mm testé par la méthode des disques (charge entre 50-100 µg/).

Il est de même pour les travaux réalisés par **Hosny et al. (2011)** qui ont isolé à partir de la mer méditerranéenne un bacille à Gram positif, nommé *B. licheniformis* NRC-18 et qui avait un pouvoir antimicrobien contre les bactéries à Gram positif comme *Staphylococcus aureus* et les bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

A l'instar, l'étude de **Kamat et al. (2011)** n'a pu mettre en évidence l'activité antimicrobienne de *Bacillus marismortus* que contre *Staphylococcus citreus* et aucune activité n'a été détectée contre les bactéries à Gram négatif testées (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ATCC 25922....), ni contre les trois autres espèces de staphylocoques à savoir *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensibles à la méthicilline et *Staphylococcus sp.* ATCC 25923.

Le surnageant a donné une activité négligeable. Il est possible que le composé inhibiteur synthétisé par cette souche ne diffuse pas dans le milieu aqueux. Cette observation est conforme aux études réalisées par **Rosenfield et Zobell (1947)**, par **Burkholder et al. (1966)** et plus tard par **Hosny et al. (2011)** où ils ont conclu que les composés inhibiteurs restent étroitement liés à la surface externe de la cellule.

Lemos et al. (1985) a conclu que si les composés antimicrobiens restaient liés aux cellules, ils pouvaient être excrétés lentement et continuellement dans l'environnement, ce qui empêchait la colonisation de l'espace adjacent par les concurrents. Une libération rapide ne donnait pas probablement à ces bactéries productrices un avantage concurrentiel, car ils seraient immédiatement emportés par le courant.

Cette étude nous a permis aussi de constater un pouvoir antifongique relativement faible en plus du pouvoir inhibiteur de cette souche contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. En raison de l'émergence de la multirésistance des bactéries et du manque d'agents antifongiques cliniquement efficaces, trouver de nouveaux agents antibactériens et /ou antifongiques est important pour le développement de nouveaux traitements cliniques.

La technique des cylindres d'agar et le disque imbibé par le surnageant n'ont pas donné une activité contre *C.albicans*, par contre, le disque imprégné par l'extrait chloroformique issue du bouillon nutritif a mis en évidence la présence d'un léger pouvoir contre cette levure, dont le diamètre était de 08 mm.

En ce qui concerne les moisissures, c'est la technique d'empoisonnement de la nourriture qui a été réalisée et a montré que l'extrait chloroformique issue du bouillon nutritif possède un pouvoir inhibiteur seulement contre *Cladosporium* avec un taux d'inhibition de 52.94% .Aucun résultat n'a été observé contre *Aspergillus*.

En effet, des études ont montré que les bactéries halotolérantes peuvent être utilisées pour synthétiser de nouvelles substances antifongiques bioactives. Trois nouveaux cyclopeptides nommés halolitoralin A ,B et C, synthétisés par *Halobacillus litoralis* YS3106 isolé d'un sédiment marin ont une activité antifongique modérée contre deux champignons pathogènes pour l'homme (*Candida albicans* et *Tricophyton rubrum*) et quatre cultures de champignons (*Gaeumannomyces graminis*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum* et *Fusarium graminearum*) (Yang et al., 2002).

Récemment, *Bacillus cereus*, *B. lentimorbus* et *B. licheniformis* ont été isolés de différents milieux hypersalins et pourraient inhiber les champignons pathogènes des plantes comme *Botrytis cinerea* et *Fusarium roseum* var. *sambucinum*, in vitro et in vivo (Sadfi-Zouaoui et al., 2008).

En somme, les résultats de la pré-caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche **ML9831** nous ont indiqué que le bouillon nutritif est le meilleur milieu de production et que le chloroforme est le meilleur solvant d'extraction.

Dans un but analytique et préparatif, une chromatographie sur couche mince a été réalisée. Ces plaques permettent de pratiquer, après la séparation, des révélations chimiques. L'extrait chloroformique issu du bouillon nutritif a été chromatographié sur des plaques en gel de silice en utilisant des mélanges de solvants. Le système de solvant qui a donné une migration rapide des molécules bioactives présentes dans notre extrait était le Chloroforme /Méthanol/Ammoniaque. Ce système a révélé la présence d'une seule tache ayant un R_f de **0.91**. Ce qui suggère que l'on est en présence, soit d'un seul composé, soit d'un groupe de composés à structure chimique très proche et inséparable par la méthode utilisée.

Des réactions chromogéniques ont été réalisées en utilisant trois révélateurs et qui sont la ninhydrine : pour les composés aminés, le réactif de Molish, pour les sucres et le $FeCl_3$, pour les composés phénoliques. Les résultats ont permis de révéler la présence de phénols et des résidus aminés, en revanche, les glucides sont absents.

En effet, de nombreuses recherches ont signalé que le genre *Bacillus* produit des composés antimicrobiens de nature peptidique. **Marahiel et al. (1997)** ont isolé une souche de *Bacillus C126* provenant de la fermentation de la canne à sucre et produit un antibiotique polypeptidique inhibant la croissance de *Micrococcus flavus*. De même, les travaux de l'équipe de **Mendo (2004)** ont mis en évidence un *Bacillus licheniformis* isolé à partir d'une source d'eau chaude dans les Açores, au Portugal, inhibant la croissance des bactéries à Gram positif par production des antibiotiques peptidiques.

L'analyse spectrale par l'infra-rouge de l'extrait chloroformique sous forme déshydraté a permis de détecter les pics caractéristiques mentionnant la présence des composés peptidique et phénoliques. Ces résultats viennent confirmer les révélations chimiques de la chromatographie sur couche mince.

Ce chapitre nous a permis de faire une pré-caractérisation des activités antimicrobiennes extracellulaires de la souche **ML9831** et un début de caractérisation, ce qui nous a permis d'avoir des résultats encourageants rendant cet isolat très intéressant à étudier profondément sur le plan biotechnologique.

III-Discussion générale

L'analyse de la diversité des communautés microbiennes d'environnements extrêmes peut présenter un intérêt économique et aussi une valeur fondamentale. De telles études contribuent d'une part à un inventaire des espèces vivantes tel que cela a été proposé par **Pace (1997)**, et d'autre part à mieux définir qu'elles pourraient être les frontières géographiques et physico-chimiques du vivant. Elles permettent aussi la recherche de potentialités biotechnologiques chez ces microorganismes. On peut voir une valeur pécuniaire au travers des processus métaboliques que l'on peut détecter, cloner et exprimer à une échelle industrielle.

La sebkha d'EL Goléa est caractérisée par une grande diversité microbiologique : bactéries et *Archaea* halophiles extrêmes qui sont considérées comme les microorganismes les plus halophiles connus sur Terre, et représentent l'essentiel des formes vivantes de ces environnements. Ce biotope peut être considéré comme un écosystème bien particulier avec une combinaison unique de la salinité, de la pollution et de l'emplacement géographique (**Hacène et al., 2004**), et peut représenter une ressource relativement inexploitée pour l'identification des microorganismes et des enzymes tolérantes avec des propriétés souhaitables pour une utilisation industrielle (**Boutaiba et al ., 2011**) et pourquoi pas de nouvelles molécules bioactives.

L'axe de recherche de l'équipe des « **Extrêmophiles** » sous la direction du Dr **Khelil N.** se situe exactement dans cette optique. De ce fait, la présente étude s'est portée sur l'identification phénotypique et génotypique d'une souche nommée **ML9831** probablement affiliée au genre *Bacillus* issue de cette sebkha comme premier objectif.

L'identification phénotypique de la souche nommée **ML9831** prouve que la bactérie en question est bien attribuée au genre *Bacillus*. Elle est halotolérante extrême, mésophile à légèrement termotolérante et neutrophile à légèrement alcalotolérante. En effet, les bactéries de ce genre sont effectivement retrouvées dans des habitats divers et notamment dans les milieux extrêmes et cela est dû à leur capacité à former des endospores.

Les caractéristiques phénotypiques seules n'étaient pas suffisantes pour caractériser l'isolat bactérien **ML9831** d'autant plus que le genre *Bacillus* est un genre complexe et peut entraîner de graves problèmes d'identification. La raison principale est que la normalisation d'une méthodologie conventionnelle a été difficile, surtout quand il s'agissait des bactéries halophiles et / ou halotolérantes qui leur caractéristiques de croissance dépendent fortement à de nombreux facteurs tels que la concentration en NaCl, température, pH et la composition du milieu (**Grant et al., 2001**).

Fritze (2002) a recommandé que les résultats de la caractérisation phénotypique ne peuvent et ne doivent pas être directement comparés sans une complète connaissance des conditions générales et précises utilisées pour un test donné. Cela peut être particulièrement vrai pour le groupe des bactéries à Gram-positif formant des endospores qui ont été auparavant classés dans le genre *Bacillus* (**Stackebrandt et Swiderski, 2002**).

C'est pour cela qu'un séquençage de l'ARN 16S a été réalisé, car le 16S est une région redondante de bases caractéristiques d'une espèce. Les résultats obtenus montrent bien qu'il s'agit d'une nouvelle souche, le groupe phylogénique le plus proche avec **96%** de similitude est la famille des *Bacillaceae*.

L'arbre phylogénique réalisé par le **Dr Cayol** au niveau de l'IRD de Marseille montre que la souche **ML9831** est proche de *Filobacillus milosensis* et de *Bacillus haloalkaliphilum* avec **95%** de similitude. Ce qui la place d'une manière définitive comme un nouveau taxon.

En fait, la **ML9831** diffère de *Filobacillus milosensis* par plusieurs caractères biochimiques notamment l'oxydase et la capacité à hydrolyser les polymères comme : l'amidon, l'esculine, la gélatine et la caséine. À l'instar, elle est presque quasi identique à *Bacillus haloalkaliphilum*, les seuls traits majeurs de différences sont :

- L'optimum de pH, où cette dernière ne pousse que dans des milieux alcalins à pH=9, alors que notre isolat est neutrophile à légèrement alcalotolérante ;
- la réduction des nitrates qui n'est pas observée chez *Bacillus haloalkaliphilum* ;

- la déficience de *Bacillus haloalkaliphilum* en esculinase et l'incapacité à hydrolyser le Tween 80.

De ce fait, sur la base de la combinaison des caractères phénotypiques et l'analyse phylogénique, nous pouvons affirmer que cet isolat est bien un nouveau genre, nouvelle espèce. Néanmoins, d'autres analyses sont en cours de réalisation notamment le pourcentage en guanine et cytosine qui ne fera que compléter notre travail, et fera l'objet dans l'avenir d'une publication.

Actuellement, les bactéries halophiles ou halotolérantes du genre *Bacillus* vivant dans les milieux extrêmes présentent beaucoup d'intérêt, car les propriétés singulières de leurs biomolécules à savoir les enzymes ont très vite attiré l'attention des biotechnologues. Dans cette étude, une combinaison de plusieurs activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires a été remarquée rendant cet isolat très intéressant.

Egalement des voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans ces conditions, mais aussi de se développer souvent de manière optimale. L'intérêt porté à ces microorganismes a abouti à la découverte d'une diversité inouïe, complètement inattendue de ces molécules.

Dans le cas des actinomycètes et en particulier le *Streptomyces*, ont été intensément exploités, ce qui n'est pas le cas pour les bactéries et en particulier le genre *Bacillus* qui est bien reconnu selon la littérature tant que bactérie productrice des composés antimicrobiens contre les bactéries pathogènes et les champignons.

Le second objectif de cette étude était une pré-caractérisation et un essai de caractérisation des activités antimicrobiennes de cette bactérie qui a été réalisée en utilisant différentes techniques de screening primaire et secondaire des activités antimicrobiennes extracellulaires.

L'activité antimicrobienne a été recherchée en premier lieu par la technique des cylindres d'agar en utilisant trois milieux de production et qui sont : le milieu **KN** exempt de sel, la gélose nutritive et le milieu Mossel.

Il s'est avéré que la **ML9831** possède un pouvoir antimicrobien contre toutes les bactéries à Gram positif test utilisées, seulement contre *Pseudomonas aeruginosa* pour les bactéries à Gram négatif et aucun pouvoir n'a été décelé contre la levure *Candida albicans*. Les plus grands diamètres de zones d'inhibition ont été obtenus avec les cylindres d'agar prélevés à partir de la gélose nutritive. Cela a été observé après avoir perçue la présence des spores. En effet, de nombreuses souches du genre *Bacillus* peuvent produire une grande variété de métabolites secondaires y compris les composés antimicrobiens et qui sont généralement produites au début de la sporulation.

Une fois l'activité antimicrobienne confirmée, un screening secondaire a été réalisé, en utilisant deux techniques : sur milieu solide afin de choisir le meilleur solvant d'extraction et sur milieu liquide.

Une extraction a été réalisée en utilisant le méthanol, l'éther, l'acétate d'éthyle et le chloroforme à partir de la gélose nutritive. Cette technique nous a permis de choisir le chloroforme comme solvant d'extraction.

En suite une production sur milieu liquide a été entamée, en utilisant le bouillon nutritif comme milieu de production et le chloroforme comme solvant d'extraction, ce qui a donné des résultats très intéressants. Il s'est avéré que la **ML9831** possède un pouvoir antimicrobien contre les bactéries à Gram positif, les bactéries à Gram négatif, un léger pouvoir contre *Candida albicans* et même contre la moisissure *Cladosporium* avec un taux d'inhibition de 52.94%.

En comparant ces deux techniques de screening secondaire, on peut conclure que la production sur milieu liquide est meilleure que sur milieu solide.

La chromatographie sur couche mince en gel de silice a montré la présence d'une seule tache ayant un R_f de **0.91** avec le système de migration : Chloroforme /Méthanol/Ammoniaque. Et la révélation chimique a indiqué la présence de composés phénoliques et peptidiques, ces derniers sont fréquemment synthétisés par le genre *Bacillus*.

L'analyse spectrale par infra-rouge de l'extrait chloroformique a montré la présence des pics caractéristiques des composés phénoliques et peptidiques, ce qui a confirmé les résultats de la révélation chimique des chromatogrammes. Du point de vue production industrielle, cet isolat est très intéressant.

En somme, cette étude nous a permis de faire une caractérisation phénotypique et génotypique de la souche nommée **ML9831**, de la positionner comme un nouveau taxon au sein des *Bacillaceae* (avec **96%** de similitude) et de **95%** de similitude avec *Filobacillus milosensis* et *Bacillus haloalkaliphilum* d'une part et de faire une pré-caractérisation des activités antimicrobiennes et un début de caractérisation des activités antimicrobiennes via les techniques de chimie fine d'autre part.

Conclusion et perspectives

Conclusion

Au cours de ces dernières années, l'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques ainsi que les mycoses systémiques aux antifongiques, a imposé aux chercheurs de trouver de nouvelles molécules issues de microorganismes provenant des milieux exotiques tels que les milieux hypersalins.

L'ensemble de ces considérations rentrent dans l'axe de recherches de l'équipe des « **Extrêmophiles** » du laboratoire **LAMAABE**.

Avant d'entreprendre cette étude, une recherche bibliographique nous a fait prendre conscience de l'importance de nos investigations concernant les bactéries halotolérantes et halophiles du genre *Bacillus* issues des milieux hypersalins. Elle nous a permis également de savoir que les travaux sur le lac d'EL Goléa d'où provient la bactérie **ML9831** ne sont pas nombreux de part sa situation géographique particulière (au cœur du Sahara Algérien).

L'étude expérimentale, divisée en deux parties, a consisté tout d'abord à faire une caractérisation de la souche **ML9831**, isolée à partir de ce lac sur milieu *Pringsheim* additionné de 30% (p / v) de NaCl (**Khelil Klouche, 1998**), à l'aide de technique de microbiologie classique et techniques moléculaires fondées sur le séquençage de l'ARN 16S. La seconde partie concerne la pré-caractérisation et un essai de caractérisation des activités antimicrobiennes synthétisées par cet isolat bactérien.

La caractérisation phénotypique de la souche nous a permis de la classer notre isolat dans le genre *Bacillus*, elle est mésophile à légèrement thermotolérante avec un optimum de 30°C, neutrophile à légèrement alcalotolérante dont l'optimum était de 7,0 et halotolérante extrême avec un optimum de croissance de 7. 5% de NaCl (p/v). Une combinaison des activités enzymatiques a été décelée rendant cette souche intéressante pour des applications biotechnologiques.

Étant donné que ce genre est largement diversifié, le séquençage était nécessaire, et ça nous a permis de mettre en évidence que la souche nommée **ML9831** est un nouvel isolat appartenant à la famille des *Bacillaceae* avec **96%** de similitude. L'arbre phylogénique montre qu'elle est proche de *Filobacillus milosensis* et de *Bacillus haloalkaliphilum* avec

95% de similitude. Ce qui nous mène à dire qu'il s'agit bien d'un nouveau genre, nouvelle espèce, rendant nos travaux publiables.

En termes de production des activités antimicrobiennes, un screening primaire par la technique des cylindres d'agar a révélé que la souche possède un pouvoir inhibiteur contre les bactéries à Gram positif et uniquement contre *Pseudomonas aeruginosa* pour les bactéries à Gram négatif, aucun pouvoir n'a été détecté contre la levure *C. albicans*. Cette technique nous a aussi permis de choisir la gélose nutritive comme milieu de production.

L'extraction par une série de solvants organiques de polarité différente nous a permis de choisir le chloroforme comme meilleur solvant d'extraction de ces activités produites par la **ML9831** à partir de la gélose nutritive. La production en utilisant le bouillon nutritif comme milieu et le chloroforme comme solvant a donné une activité contre les bactéries à Gram positif, les bactéries à Gram à négatif, contre *C. albicans* (un léger pouvoir inhibiteur) et une inhibition qui dépasse les 50% pour la moisissure *Cladosporium spp.* Mais en recensant ces résultats, notre isolat est plutôt bactéricide que fongicide.

La séparation par la chromatographie sur couche mince de l'extrait chloroformique a donné une seule tache révélée par le système de solvant Chloroforme /Méthanol/Ammoniaque, son R_f est de **0.91**. Les réactions chromogéniques ont permis de révéler la présence de phénols et des composés protéiques. En revanche, les résidus glucidiques sont absents. La spectroscopie infra-rouge vient confirmer les résultats de la révélation chimique de la chromatographie.

Cette étude n'est qu'un tout premier essai de caractérisation des bactéries halotolérantes productrices de composés antimicrobiens provenant des milieux hypersalins.

Cette contribution à l'étude du potentiel biotechnologique concernant la production des activités antimicrobiennes élaborées par cette souche peut être complétée par des études supplémentaires et nécessaires afin d'identifier ces composants. Par conséquent, ce travail ouvre des perspectives diverses :

- 1- Microscopie électronique de l'isolat qui valorisera notre caractérisation phénotypique et génotypique ;
- 2- La purification des activités antimicrobiennes qui doit être faite par le biais des techniques chromatographiques et spectrométriques très sensibles et reproductibles, tels que : la bioautographie, la chromatographie sur colonne, la HPLC , la spectroscopie de masse, RMN ainsi que l'utilisation des méthodes d'analyses des substances bioactives qui doivent répondre à de nombreuses exigences notamment la stabilité, la sélectivité et la non toxicité afin de les utiliser dans le domaine thérapeutiques ou dans d'autres domaine, si toutefois, elle présentent un avantage réel par rapport aux composés déjà commercialisés.

Une piste très intéressante à suivre serait l'optimisation des paramètres cultureux afin d'améliorer la production de ces composés. Par ailleurs, il est à signaler que les manipulations d'extraction, de purification et de caractérisation chimique des biomolécules sont très délicates, fastidieuses et coûteuses.

- 3- Autre intérêt biotechnologique, concernant les enzymes hydrolytiques extracellulaires produites par cette bactérie, l'étude de leurs propriétés doit être menée à bout afin de pouvoir déterminer la rentabilité de leur exploitation. Ainsi, déterminer les conditions optimales de production, les limites physiologiques d'excrétion de ces enzymes, mais aussi les paramètres de culture pouvant affecter l'activité enzymatique. L'isolement, la purification, et la caractérisation biochimique et biophysique de ces enzymes feront suite.

Références bibliographiques

A

Albers S., Vossenbergh J., Driessen A. and Konings W., 2001. Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions. *Extremophiles*; 5: 285-294.

Amend J.P., Rogers K.L., Shock E.L., Gurrieri S. and Inguaggiato S., 2003. Energetics of chemolithoautotrophy in the hydrothermal system of Vulcano Island, southern Italy. *Geobiology*; 1: 37-58.

Amoozegar M.A., Fatemi Z.A., Karbalaeei-Heidari H.R. and Razavi M.R., 2007. Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiology Research*; 162: 369-377.

Andrews J.M. and Wise R., 2002. Susceptibility testing of *Bacillus* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 49:1039–1046.

Arahal D.R., Castillo A.M., Ludwig W., Schleifer K.H. and Ventosa A., 2002 . Proposal of *Cobetia marina* gen. nov. comb. nov., within the Family *Halomonadaceae*, to include the species *Halomonas marina*. *Systematic and Applied Microbiology*; 25: 207-211.

Ash C., Farrow J.A.E., Wallbanks S. and Collins M.D., 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*; 13: 202- 206.

Ash C., Priest F. G. and Collins D., 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*; 64: 253–260.

Awais M., Shah A.A., Hameed A. and Hasan F., 2007. Isolation, identification and optimization of Bacitracin produced by *Bacillus sp.* *Pakistan Journal of Biological Sciences* ; 39 : 1303-1312.

Awais M., Pervez A., Qayyum S. and Saleem M., 2008. Effects of glucose, incubation period and pH on the production of peptide antibiotics by *Bacillus pumilus*. *African Journal of Microbiology Research* ; 2: 114-119.

Ayari A., Morakchi H. and Kirane Gacemi D., 2012. Identification and antifungal activity of *Streptomyces sp.* S72 isolated from Lake Oubeira sediments in North- East of Algeria. *African Journal of Biotechnology* ; 2 :305-311.

Aygan A., Arikan B., Korkmaz H., Dinçer S. and Çolak Ö., 2008. Highly thermostable and alkaline α -amylase from a halotolerant alkaliphilic *Bacillus sp.* AB68. *Brazilian Journal of Microbiology* ; 39: 547-553.

B

Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N., 2005. Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharien sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie Médicale*; 15: 211–219.

Baker-Austin C. and Dopson M., 2007.Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiology*; 15:165-171.

Baliga N.S., Bonneau R., Facciotti M.T., Pan M., Glusman G., Deutsch E.W., Shannon P., Chiu Y., Weng R.S. and Gan R.R., 2004. Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the Dead Sea. *Genome Research*; 14: 2221-34.

Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C. and Turck M., 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*; 45:493–496.

Beguin P. and Aubert J.P., 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiological Reviews* ; 13: 25-28.

Benlloch S., Lopez-Lopez A., Casamayor E.O., Øvreas L., Goddard V., Daas F.L., Smerdon G., Massana R., Joint I., Thingstad F., Pedro-Alió C. and Rodríguez Valera F., 2002. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environmental Microbiology*; 4 : 349-360.

Biomérieux, 2006. *Applications Bio Pharmaceutiques*. Http : www.biomerieux.fr/servlet/srt/srt/bio/france/dyn

Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H.G., Northcote P.T. and Prinsep M.R., 2006. Marine natural products. *Natural Products Reports*; 23:26–78.

Borsodi A. K., Ma´rialigeti K., Szabo´ G., Palatinszky M., Polla´k. B., Ke´ki, Z., Kova´cs A.L., Schumann P. and To´th E. M., 2008. *Bacillus aurantiacus* sp. nov., an alkaliphilic and moderately halophilic bacterium isolated from Hungarian soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 58: 845–851.

Bouchotroch S., Quesada J., del Moral A., Llamas I. and Béjar V., 2001. *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ; 51 : 1625-1632.

Boutaiba S., Hacène H., Bidle K. A. and Maupin-Furlow J. A. ,2011. Microbial Diversity of the Hypersaline Sidi Aneur and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. *Journal of Arid Environment.* ; 10: 909–916.

Brock T. D., 1965. The road to Yellowstone-and Beyond. *Annual Review of Microbiology* ; 49:1-28.

Burkholder P.R., Pfister R.M. and Leitz F.H., 1966 .Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. *Applied Microbiology*; 4: 649-653.

Bursy J., Kuhlmann A.U., Pittelkow M., Hartmann H., Jebbar M., Pierik A.J. and Bremer E.,2008.Synthesis and uptake of the compatible solute ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stresses. *Applied and Environmental Microbiology*; 74: 7286-7296.

C

Carrasco I. J., Ma´rquez M.C., Xue Y.,Ma Y.,Cowan D.A., Jones B. E., Grant W. D. and Ventosa A.,2007a. *Bacillus chagannorensis* sp. nov., a moderate halophilic from a soda lake in Inner Mongolia, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 57:2084–2088.

Cerritos R., Vinuesa P., Eguiarte L. E., Herrera-Estrella L., Alcaraz- Peraza L. D., Arvizu-Go´mez J. L., Olmedo G., Ramirez E., Siefert J. L. and Souza V., 2008. *Bacillus coahuilensis* sp. nov., a moderately halophilic species from a desiccation lagoon in the Cuatro Cie´negas Valley in Coahuila, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 58: 919–923.

Chen Y.G., Cui X.L., Zhang Y.Q., Li W.J., Wang Y.X., Xu L.H., Peng Q., Wen M.L. and Jiang C.L., 2008 .*Gracilibacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 58: 2403–2408.

Chen Y.G., Zhang Y.Q., Wang Y.X., Liu Z.X., Klenk H.P., Xiao H.D., Tang S.K., and Li W.J., 2009. *Bacillus neizhouensis* sp. nov., a halophilic marine bacterium isolated from a sea anemone. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 59: 3035–3039.

Chen L., Guangyu W., Tong B., Yunbin Z., Yixin W., Ming L. and Xiukun L., 2010. Phylogenetic analysis and screening of antimicrobial and cytotoxic activities of moderately halophilic bacteria isolated from the Weihai Solar Saltern (China). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* ; 26:879–888.

Chen Y.G., Zhang Y.Q., Chen Q.H., P Klenk 1.H., He J.W., Tang S.K., Cui X.L. and Li W.J., 2011. *Bacillus xiaoxiensis* sp. nov., a slightly halophilic bacterium isolated from non-saline forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 61: 2095–2100.

Cheng T.R., Fang A., and Demain A.L., 1995. Effect of amino acids on rampycin biosynthesis by *Sytreptomyces hygrosopicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 6:1096-1098.

Cherry J.R. and Fidantsef A.L., 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*; 14: 438-443.

Chookietwattana K., 2003. Diversity of halophilic bacteria in saline soil at nong boreservoir, Mahasarakham, province, Thailand. Environmental Biology, Suranaree University of Technology, Thailand.

Cladera-Olivera F., Caron G.R. and Brandelli A., 2004. Bacteriocin-like peptide production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Letters in Applied Microbiology* ; 38: 251 -256.

Claus D. and Berkeley R.C.W., 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174AL. In Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J.G. (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, USA.

CLSI -Clinical and Laboratory Standards Institute- 2010. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Eighth*, Pennsylvania, USA.

Cohen G.N., 2011. *Microbial Biochemistry, 2nd Edition* .Springer, New York, USA.

Cook R.J., 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*; 31: 53–80.

Coonrod J. D., Leadley P. J. and Eickhoff T.C., 1971. Antibiotic susceptibility of *Bacillus* species. *Journal of Infectious Diseases* ; 123: 102-105.

Cos P., Arnold J.V., Dirk V.B. and Louis M., 2006. Anti-infection potential of natural products : How develop a stronger in vitro « proof-of-concept ». *Journal of Ethnopharmacology*; 106:290-302.

Cowan M.M., 1999. Plant Product as Antimicrobial Agent. *Clinical Microbiology Reviews*; 12 :564-582.

D

D'Alessandro C.P., De Castro R.E., Giménez M.I. and Paggi R.A., 2006. Effect of nutritional conditions on extracellular protease production by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. *Letters in Applied Microbiology* ; 44: 637–642.

DasSarma S. and Arora P., 2002. Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences, London, Nature Publishing Group*; 8:458-466.

De Long E.F., Wu K.Y., Prezelin B.B. and Jovine R.V., 1994. High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. *Nature* ; 371 : 695-697.

Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R., 2007.*Bactériologie médicale – Techniques usuelles.* Elsevier Masson, Paris, France.

Devine K. M., 1995. The *Bacillus subtilis* genome project: aims and progress. *Tibtechnology*; 13: 210-216.

De Soete G., 1983.A least square algorithm for fitting additive trees to proximaty data. *Psychometrika* ; 48 :612-626.

De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B., 2009. *Bergey'S Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition., Volume Three, The Firmicutes.* Springer, New York, USA.

Donadio S., Monciardini P., Alduina R., Mazza P., Chiocchini C., Cavaletti L., Sosio M. and Puglia A.M., 2002. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology* ; 3:187-198.

E

Eichler J., 2001. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnology Advances* ; 19: 261– 278.

Espinelle-Ingroff A., 2007. Standardized Disk Diffusion Method for yeast. *Clinical Microbiology Newsletter*; 29:97-100.

Essghaier B., Hedi A., Hajlaoui M.R., Boudabous A. and Sadfi-Zouaoui N., 2011. *In vivo* and *in vitro* evaluation of antifungal activities from a halotolerant *Bacillus subtilis* strain J9. *African Journal of Microbiology Research* ; 19 :4073-4083.

Euzéby J.P., 2008. *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature.*
<http://www.bacterio.cict.fr/>

F

Falb M., Pfeiffer F., Palm P., Rodewald K., Hickmann V., Tittor J. and Oesterhelt D., 2005. Living with two extremes: Conclusions from the genome sequence of *Natronomonas pharaonis*. *Genome Research* ; 15: 1336-1343.

Felsenstein J., 1993. *Phylogenetic inference package version 3.5.1.* Department of Genetic , University of Washington ,Seattle , USA.

Fortina M. G., Pukall R., Schumann P., Mora D., Parini C., Manachini P.L. and Stackebrandt E., 2001. *Ureibacillus gen. nov.*, a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* (Andersson *et al.*, 1995), emendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus sp. nov.* *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ; 51 : 447–455.

Fritze D., 1996. *Bacillus haloalkaliphilum sp. nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology*; 46: 98-101.

Fritze D., 2002. *Bacillus* identification- traditional approaches. In : Berkeley R., Heyndrickx M., Logan N., De Vos P. (ed) *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives* .Oxford: Blackwell, UK.

Futterer O., Angelov A., Liesegang H., Gottschalk G., Schleper C., Schepers B., Dock C., Antranikian G. and Liebl W., 2004. Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 101: 9091-9096.

G

Galinski E.A., 1995. Osmoadaptation in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*; 37:272-328.

Gareeb A.P. and Setati M.E., 2009 .Assessment of alkaliphilic haloarchaeal diversity in Sua pan evaporator ponds in Botswana. *African Journal of Biotechnology*; 8: 259-267.

Garveba P., Van Veen I.A. and Van Elsas J.D., 2003. Predominant *Bacillus* spp. In: Agricultural soil under different management regimes via PCR-DGGE. *Microbial Ecology*; 45:302- 31.

Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W.A. and Krieg N.R., 1994. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington DC, ASM, USA.

Ghanem A., 2007. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/ enriched compounds. *Tetrahedron* ; 8: 1721-1754.

Grant W.D. and McGenity T.J., 1998. Halophiles. In :Horikoshi K., Grant W.J. (ed) *Extremophiles: Microbial life in extreme environments*. Wiley-Liss, Inc. New York, USA.

Grant W.D., Kamekura M., McGenity T.J, and Ventosa A., 2001. Order I *Halobacteriales* Grant and Larsen 1989b, 495vp. In: Boone D.R., Calstenholz R.W., Garrity G.M. (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. I, 2nd Ed)* .Springer-Verlag, Berlin.

Grant W.D., 2004. Life at low water activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*; 359: 1249–1267.

Guiraud J.P., 1998. *Techniques d'analyses microbiologiques : Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris, France.

Guo X., Li D., Lu W., Piao X. and Chen X., 2006. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 90: 139-146.

Gupta R., Gupta N. and Rathi P., 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Microbiology and Biotechnology*; 6:763-81.

H

Hacène H., Rafa F., Chebhouni N., Boutaiba S., Bhatnagar T., Baratti J. C.and Ollivier B., 2004. Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea salt Lake, Algerian Sahara. *Journal of Arid Environment*; 58: 273-284.

Harley J.P. and Prescott L.M., 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology, 5th Ed*. McGraw-Hill, USA.

Henstra A.M., Dijkema C. and Stams A.J.M., 2007. *Archaeoglobus fulgidus* couples CO oxidation to sulfate reduction and acetogenesis with transient formate accumulation. *Environmental Microbiology*; 9: 1836-1841.

Heyndrickx M., Lebbe L., Kersters K., De Vos P., Forsyth G. and Logan N.A., 1998. *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight, 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*; 4: 99-106.

Horikoshi K., 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* ; 63: 735-750.

Horikoshi K., 2006. *Alkaliphiles: Genetic Properties and Applications of Enzymes*. Springer, Berlin, Germany.

Hosny A.D., Hosni Sheir D. and Eldewany A., 2011. Production of Antimicrobial Agent from Marine Bacteria Isolated from Mediterranean. *Australian Journal Basic and Applied Sciences* ; 5 : 121-128.

Huber R., Thomm M., König H., Thies G. and Stetter K.O., 1982. *Methanococcus thermolithotrophicus* a novel thermophilic lithotrophic methanogen. *Archive of Microbiology*; 132: 47-50.

I

Itoh T., Yamagushi T., Zhou P. and Takashina T., 2005. *Natronolimnobius baerhuensis* gen. nov., sp. nov., and *Natronolimnobius innermongolicus* sp. nov., novel haloalkaliphilic archaea isolated from soda lakes in inner Mongolia, China. *Extremophiles* ; 9 : 111-116.

Iwai Y. and Omura S., 1982. Culture conditions for screening of new antibiotics. *Journal of Antibiotics*; 35:123–141.

J

Jaruchoktawechai C., Suwanborirux K., Tanasupawatt S., Kittakoop P. and Menasveta P., 2000. New Macrolactins from a Marine *Bacillus* sp. Sc026. *Journal of Natural Products*; 63:984-986.

Joffin J.N. and Leyral G., 2006. *Microbiologie Technique. Tome 1, dictionnaire des techniques.* Académie de bordeaux et crdp d'Aquitaine, France.

Jonson J.L., 1989. Nucleic acid in bacterial identification. In: *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, Volume 4.* (ed) Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. Williams and Wilkins Press .Baltimore, USA.

Joo H.S. and Chang C.S., 2005. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from a halo-tolerant *Bacillus clausii* I-52: enhanced production and simple purification. *Journal of Applied Microbiology* ; 98 :491-497.

Joshi A.A., Kanekar P.P., Kelkar A.S., Shouche Y.S., Vani A.A., Borgave S.B. and Sarnaik S.S., 2008. Cultivable bacteria diversity of alkaline Lonar lake India. *Microbial Ecology* ; 55:163–172.

Jukes T.H. and Cantor C.R., 1969. Evolution of protein molecules .In :Munzo H.N. (ed) *Mammalian protein metabolism* .Academic Press ,New York,USA.

K

Kamat T.K., Kiran S. and Kerkar S., 2011. Antimicrobial potential of *Bacillus marismortui*, a salt pan isolate of Cavellosim ,Goa,India. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*; 3: 321-328.

Kamat T., and Kerkar S., 2011. Bacteria from Salt Pans: A Potential Resource of Antibacterial Metabolites. *Recent Research in Sciences and Technology*; 9: 46-52.

Karbalaei-Heidari H.R., Amoozegar M.A. and Ziaee A.A., 2009. Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* ; 36: 21- 27.

Kaur J., Chadha B.S., Kumar B.A. and Saini H.S., 2007.Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *Biores Technology*; 98: 74-81.

Kerkar S., 2004.Ecology of Hypersaline Microorganisms. Department of Biotechnology, Goa University, Goa, *Mar Microbiology* ; chap 05:37-47.

Kharroub K., 2007. Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse de doctorat, Université Mentouri-Constantine, Algérie.

Khelil Klouche N., 1998. Etude des antibiotiques biosynthétisés par des bactéries filamenteuses extrêmophiles, notamment *Metallogenium* sp. Thèse de magister, Université de Tlemcen, Algérie.

Kristjansson J.K. and Hreggvidsson G.O., 1995. Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*; 11:17-25.

Kushner D.J., 1993. Growth and nutrition of halophilic bacteria, In: Vreeland R.H., Hochstein L.I. (ed) *The Biology of Halophilic Bacteria* .Boca Raton, CRC Press.

L

Larsen H., 1962. Halophilism. In: Vreeland R.H. and Hochstein L.I. (ed) *The Biology of Halophilic Bacteria* .Boca Raton, CRC Press .

Lee J .C., Lim J .M., Park D. J., Jeon C.O., Li W. J. and Kim C. J., 2006. *Bacillus seohaeanensis* sp. nov., a halotolerant bacterium that contains l-lysine in its cell wall. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 56: 1893–1898.

Le Minor L. and Véron M., 1990. *Bactériologie médicale*. Médecine-Sciences Flammarion, France.

Lemos M.L., Toranzo A.E. and Barjia L.J., 1985 .Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. *Microbial Ecology*; 11: 149-163.

Lewinson O., Padan E. and Bibi E., 2004. Alkalitolerance: A biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* ; 39: 14073-14078.

Leyral G. and Vierling E ., 2007.*Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaire ; Biosciences et techniques* . Wolters Kluwer ,France.

Litchfield C.D., 2002. Halophiles. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*; 28: 21–22.

Litchfield C.D. and Gillevet M.P., 2002. Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: A preliminary assessment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* ; 28:48-55.

Logan N.A., Lebbe L., Hoste B., Goris J., Forsyth G., Heyndrickx M., Murray B.L., Syme N., Wynn-Williams D.D. and De Vos P., 2000. Aerobic endospore-forming bacteria from geothermal environments in northern Victoria Land, Antarctica, and Candlemas Island, South Sandwich archipelago, with the proposal of *Bacillus fumarioli* sp. nov. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 50: 1741–1753. .

Logan N.A., Lebbe L., Verhelst A., Goris J., Forsyth G., Rodriguez- Diaz M., Heyndrickx M. and De Vos P., 2002b. *Bacillus luciferensis* sp. nov., from volcanic soil on

Candlemas Island, South Sandwich archipelago. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ; 52: 1985–1989.

Logan N.A., Popovitch T.J. and Hoffmaster A., 2007. *Bacillus* and related genera. In: Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Pfaller M. A., and Tenover F. C. (ed) *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Logan N.A., Berge O., Bishop A.H., Busse H.J., De Vos P., Fritze D., Heyndrickx M., Kaampfer P., Salkinoja-Salonen M.S., Seldin L., Rabinovitch L. and Ventosa A., 2009a. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 59:2114-2121.

Ludwig W., Schleifer K.H. and Whitman W.B., 2008. Revised road map to the phylum *Firmicutes*. In: de Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A.,

Schleifer K.H. and Whitman W.B. (ed): *Bergey's manual of systematic bacteriology vol 3, 2ⁿ EDT*. Springer, New York, USA.

Lund E. and John W., 2007. Characteristics, development and utilization of geothermal resources. *Q. Bull*; 28: 1-9.

M

Madigan M.T. and Martino J.M., 2006. *Brock Biology of Microorganisms, 11th ed.*; Pearson Education. Upper Saddle River, NJ, USA.

Maraheil M.A., Stachelhaus T. and Mootz H.D., 1997. Modular peptide synthetases involved in non-ribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews* ; 97: 2651-2673.

Margesin R. and Schinner F., 2001. Potential of halotolerant microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* ; 5 : 73–83.

Martins R.F., Davids W., Al-Sond W.A., Levander F., Radström P. and Hatti-Kaul R., 2001. Starch-hydrolyzing bacteria from Ethiopian soda lakes. *Extremophiles*; 5: 135-144.

Maturrano L., Santos F., Rosselló-Mora R. and Antón J., 2006b. Microbial Diversity in Maras salterns, a Hypersaline Environment in the Peruvian Andes. *Applied and Environmental Microbiology*; 72: 3887-3895.

McGenity T.J., Gemmell R.T. and Grant W.D., 2000. Stan-Lotter, Helga. Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environmental Microbiology*; 3: 243-250.

Mendo S., Faustino N.A., Sarmiento A.C., Amado F. and Moir A.J., 2004. Purification and characterization of a new peptide antibiotic produced by a thermotolerant *Bacillus licheniformis* strain. *Biotechnology Letters*; 26: 115-119.

Mesbah N.M. and Wiegel J., 2008. Life at extreme limits: the anaerobic halophilic alkalithermophiles. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1125: 44-57.

Morozkina E.V., Slutskaya E.S., Fedorova T.V., Tugay T.I., Golubeva L.I. and Koroleva O.V., 2010. Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application. *Applied Biochemistry and Microbiology*; 46: 1-14.

Moshafi M.H., Forutan H. and Mehrabani M., 2006. Investigation of antibacterial effects of *Hibiscus Sabdariffa* L. dried calyx by agar diffusion and bioautographic methods. *Journal of Korean Medical Science*; 13: 103-110.

Motta A.S., Cladera-Olivera F. and Brandelli A., 2004. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon Basin. *Brazilian Journal of Microbiology*; 35:307-310.

Moyne A.L., Shelby R., Cleveland T.E. and Tuzun S., 2001. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology* ; 90: 622-629.

N

Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau AR, Novikova RV., Grigoryan AA., Ivanova AE., Lysenko, AM., Petrunyaka V.V., Osipov S.S., Ba1yaev S.S. and Ivanov M.V., 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: description of *Gebacillus subterraneus* gen. nov. sp. nov. and *Geobacillus uzensis* sp. novo from petroleum reservoirs and transfer and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*,

Bacillus thermoglucosidasius and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *International Journal of Bacteriology*; 51:433-446.

Nicholson W.L., Munakata N., Horneck G., Melosh H. and Setlow P., 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 64:548-572.

Nicholson W.L., 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Science*; 59: 410–416.

Niimura Y., Koh E., Yanagida F., Suzuki K.-I., Komagata K. and Kozaki M., 1990. *Amphibacillus xylanus* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic sporeforming xylan-digesting bacterium which lacks cytochrome, quinone, and catalase. *International Journal of Bacteriology* ; 40 : 297–301.

Nowlan B., Dodia M. S., Singh S.P. and Patel B. K. C., 2006. *Bacillus okhensis* sp. nov., a halotolerant and alkalitolerant bacterium from an Indian saltpan. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 56: 1073–1077.

O

Olsen G.J., 1988. Phylogenetic analysis using ribosomal RNA .In: Wood W.A. (ed) *Methods in enzymology* , Academic Press , New York and London.

Ongena M. and Jacques P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*; 16 :115–125.

Onishi H., Mori T., Takeuchi S., Tani K., Kobayashi T. and Kamekura M., 1983. Halophilic nuclease of a moderately halophilic *Bacillus sp.*: production, purification, and characterization. *Applied and Environmental Microbiology* ;45 : 24–30.

Oren A., 2002.Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology and application. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* ; 28:56-63.

Oren A., 2002b .Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology*; 39: 1-7.

Oren A., 2006. Life at high salt concentrations. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H.and Stackebrandt E. (ed) *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry*. Springer, New York, USA .

Oren A., 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline System* ; 4: 2- 8.

P

Pace N.R., 1997. A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science* ; 276 :734-740.

Pappa A., Sa´ nchez-Porro C., Lazoura P., Kallimanis A., Perisynakis A., Ventosa A., Drainas C. and Koukkou A. I. 2010. *Bacillus halochares sp. nov.*, a halophilic bacterium isolated from a solar saltern. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 60:1432–1436.

Pedersen K., Nilsson E., Arlinger J., Hallbeck L. and O’Neill A., 2004 .Distribution, diversity and activity of microorganisms in the hyper-alkaline spring waters of Maqarin in Jordan. *Extremophiles* ; 8: 151-164.

Pelaez F., Collado J., Arenal F., Basilio A., Cabello A., Matas M.T.D., Garcia J.B., Del Val A.G., Gonzalez V., Gorrochategui J., Hernandez P., Martin I., Platas G. and Vicente F., 1998. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. *Mycological Research* ; 102:755–761.

Peng Q.Z., Peng Q.J., Zhang Y.Q., Liu Z.X., Wang Y.X., Li W.J., Cui X.L and Chen Y.G., 2009. *Halobacillus hunanensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a subterranean brine. *Antonie van Leeuwenhoek* ; 96:497–504.

Pinchuk I.V., Bressollier P., Verneuil B., Fenet B., Sorokulova I.B., Graud F. and Urdaci M.C., 2001. *In Vitro* Anti-*Helicobacter pylori* Activity of the Probiotic Strain *Bacillus subtilis* 3 Is Due to Secretion of Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 45: 3156–3161.

Prakash B., Vidyasagar M., Madhukumar M.S., Muralikrishna G. and Sreeramulu K., 2009. Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α -amylase from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochemical*; 44: 210-215.

Priest F.G., Sonenshein A.L., Hoch J.A. and Losick R., 1993. *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*. Washington D.C., American Society for Microbiology, USA.

R

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. and Deshpande V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* ; 62 :597-635.

Rebib H., Hedi A., Rousset M., Boudabous A., Limam F. and Sadfi-Zouaoui N ., 2012. Biological control of *Fusarium* foot rot of wheat using fengycin-producing *Bacillus subtilis* isolated from salty soil. *African Journal of Biotechnology*; 34:8464-8475.

Reghioua S., Boughachiche F., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A. and Boulahfrouf A., 2008. Séparation et caractérisation préliminaire d'antibiotiques produits par une souche représentative d'actinomycètes isolés de sol aride de la région de Biskra. *Sciences & Technologie C .*; 28 : 59-64.

Roberts M.F., 2004. Osmoadaptation and osmoregulation in Archaea. *Frontiers in Bioscience*; 9:1999-2019.

Roberts M.F., 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*; 10:1-5.

Rodriguez-Valera F., 1991. *General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms*. Plenum Press, New York, USA.

Rodriguez-Valera F., 1993. Introduction to Saline Environments. In: Vreeland R.H. and Hochstein .L.I. (ed): *The biology of halophilic bacteria*. Boca Raton, CRC Press.

Rohban R., Amoozegar M .A. and Ventosa A., 2009 . Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolases from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*; 36: 333-340.

Rohwerder T. and Sand W., 2007. Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. *Engineering in Life Sciences*; 7:301-309.

Rosenfield W.D. and Zobell C.E., 1947. Antibiotic production by marine microorganisms. *Journal of Bacteriology*; 54: 393-398.

Rossler D., Ludwig W., Schleifer K. H., Lin C., McGill T. J., Wisotzkey J. D., Jurtshuk P. and Fox G. E., 1991. Phylogenetic diversity in the genus *Bacillus* as seen by 16S rRNA sequencing studies. *Systematic and Applied Microbiology*; 14: 266–269.

Rouessac F., Rouessac A. et Cruché D., 2004. *Analyse Chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes, 6^{ème} édition.* Dunod, Paris, France.

S

Sa´nchez-Porro C., Marti´n S., Mellado E. and Ventosa A., 2002. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology* ; 94 : 295–300.

Sabaou N., 1980. Antagonisme de deux Actinomycètes vis-à-vis du *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* (Killian et Maire) Gordon et d'autre champignon. Thèse de Magistère, Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, Alger, Algérie.

Sabaou N., Amir H. et Bounaga D., 1980. Le palmier dattier et la fusariose. X. Dénombrement des actinomycètes de la rhizosphère ; leur antagonisme vis à vis de *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*. *Annual Review of Phytopathology*; 12: 253-257.

Sadfi-Zouaoui N., Essghaier B., Hajlaoui M.R., Fardeau M.L., Cayaol J.L., Ollivier B. and Boudabous A ., 2008. Ability of moderately halophilic bacteria to control grey mould disease on tomato fruits. *Journal of Phytopathology*; 156:42–52.

Satyanarayana T., Raghukumar C. and Shivaji S., 2005. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*; 89: 78-90.

Schallmeyer M., Singh A. and Ward O.P., 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*; 50: 1-17.

Schlesner H., Lawson P. A., Collins M .D., Weiss N., Wehmeyer U., Voß lker H. and Thomm M., 2001. *Filobacillus milosensis* gen. nov., sp. nov., a new halophilic spore-forming bacterium with Orn-D-Glu-type peptidoglycan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 51: 425–431.

Setyorini E., Takenaka S., Murakami S. and Aoki K., 2006. Purification and characterization of two novel halotolerant extracellular protease from *Bacillus subtilis* strain FP-133. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*; 70: 433-440.

Shi R., Yin M., Tang S.K., Lee J. C., Park D.J., Zhang Y.J., Kim C.J. and Li W.J., 2011. *Bacillus luteolus* sp. nov., a halotolerant bacterium isolated from a salt field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 61: 1344–1349.

Shida O., Takagi H., Kadowaki K. and Komagata K., 1996a. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. . *International Journal of Systematic Bacteriology*; 46: 939–946.

Shivanand P. and Jayaraman G., 2009. Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochemistry* ; 10: 1088-1094.

Siglioccolo A., Paiardini A., Piscitelli M. and Pascarella S., 2011. Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. *BMC Structural Biology*; 11: 50 -53.

Sinchaikul S., Sookkheo B., Topanuruk S., Juan H.F., Phutrakul S. and Chen S.T., 2002. Bioinformatics, functional genomics, and proteomics study of *Bacillus sp.* *Journal of Chromatography Science*; 771: 261-287.

Soliman K.M. and Badeaa R.I., 2002 .Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic Fungi. *Food and Chemical Toxicology*; 4: 1669–1675.

Sorokin D.Y., Tourove T.P., Galinski E.A., Belloch C. and Tindall B.J., 2006. Extremely halophilic denitrifying bacteria from hypersaline inland lakes, *Halovibrio denitrificans* sp. nov., and *Halospina denitrificans* gen. nov. sp. nov. and evidence that the genus name *Halovibrio* (**Fendrich ,1989**) with the type species *H. variabilis* should be associated with DSM 3050. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ; 56 :379-388.

Souza V.R., Silva A.C.G., Pinotti L.M., Araújo H.S.S. and Giordano R.L.C.C., 2005. Characterization of the penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Brazilian Archivos of Biology and Technology* ; 48:105-111.

Stachelhaus T., Mootz H.D. and Marahiel M.A., 2002. Nonribosomal assembly of peptide antibiotics on modular protein templates. In : Sonenshein A.L., Hoch J.A. and Losick R. (ed)

Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells. ASM Press, Washington, D.C., USA.

Stackebrandt E. and Swiderski J., 2002. From phylogeny to systematics: the dissection of the genus *Bacillus*. In: Berkeley R., Heyndrickx M., Logan N. and De Vos P.(ed) *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives.* Oxford : Blackwell.

Stein T., 2005 .*Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*; 56: 845-57.

T

Takai K., Nealson K.H. and Horikoshi K., 2004 b. Methanotorris formicicus sp. nov., a novel extremely thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a black smoker chimney in the Central Indian Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ; 54: 1095-1100.

Tiquia S.M., Davis D., Hadid H., Kasparian S., Ismail M., Sahly R., Shim J., Singh S. and Murray K.S., 2007. halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow groundwater along the red river of southeastern Michigan. *Enviroment Technology* ; 28 :297-307.

Tiqula S. M., Davis D., Hadid H., Kasparian I., Sahly Shim S. and Murray K. S., 2006. Halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow groundwater along the rouge river of southern Michigan. *Enviroment Technology*; 28: 297-307.

Tortorano A.M., Cabrini E. and Viviani M.A., 1979 .Sensibilité *in vitro* des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes C.M.I. en gélose et méthode des disques. *Bulletin de la Société Française de la Mycologie Médicale* ; 8 : 69-74.

U

Ulrih N.P., Gmajner D. and Raspor P., 2009. Structural and physicochemical properties of polar lipids from thermophilic archaea. *Applied Microbiology and Biotechnology* ; 84:249-260.

V

Vargas V. A., Delgado O. D., Hatti-Kaul R. and Mattiasson B., 2005. *Bacillus bogoriensis* sp. nov., a novel alkaliphilic, halotolerant bacterium isolated from a Kenyan soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 55: 899–902.

Vargas C., Argandona M., Reina-Bueno M., Rodriguez-Moya J., Fernandez-Aunion C. and Joaquin J.N., 2008. Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance. *Saline Systems*; 4: 1-14.

Ventosa A., Nieto J. J. and Oren A., 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* ; 62: 504–544.

Vidyasagar M., Prakash S., Mahajan V., Shouche Y.S. and Sreeramulu K., 2009. Purification and characterization of an extreme halothermophilic protease from a halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. TVSP101. *Brazilian Journal of Microbiology* ; 40: 12-19.

Vreeland R.H., 1993. Taxonomy of halophilic bacteria. In: Vreeland R.H. and Hochstein L.I. (ed) *The Biology of Halophilic Bacteria* .Boca Raton; CRC Press.

W

Wainø M., Tindall B. J., Schumann P. and Ingvorsen K., 1999. *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov.; transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* to the genus

Salibacillus gen. nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*; 49: 821–831.

Wainwright M., 2003. A microbiologist looks at panspermia. *Astrophysics and Space Science* ; 285: 563-570.

Whipps J. M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*; 52:487- 511.

Wisotzkey J.D., Jurtshuk P., Fox G.E., Deinhard G. and Poralla K., 1992. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* ; 42 : 263–269.

Woese C. R. and Fox G. E., 1977. The concept of Cellular Evolution. *Journal of Molecular Evolution*; 10: 1-6.

Y

Yang L., Tan R. and Wang Q ., 2002. Antifungal cyclopeptides from *Halobacillus litoralis* YS3106 of marine origin. *Tetrahedron Letters*; 37:6545–6548.

Yoon J.-H., Weiss N., Lee K.C., Lee I.S., Kang K.H. and Park Y.H., 2001. *Jeotgalibacillus alimentarius* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from jeotgal with L-lysine in the cell wall, and reclassification of *Bacillus marinus* Ruger 1983 as *Marinibacillus marinus* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 51: 2087–2093.

Yoon J.H., Kim I.G., Kang K. H., Oh T.K. and Park Y.H., 2003. *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 53: 1297–1303.

Yu G.Y., Sinclair J.B., Hartman G.L. and Bertagnolli B.L., 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*; 34:955–963.

Z

Zaitlin B. and Watson S.B., 2006. Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. *Water Research*; 40:1741-1753.

Annexes

Annexe 01 : Préparation des milieux de cultures utilisés et de quelques réactifs.

Milieux gélosés

Gélose nutritive :	
Peptone	15
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	02g
Chlorure de sodium	05g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml
	pH =6,8-7,4
Gélose à ADN	
Tryptose	20g
Acide desoxyribonucleique	02g
Chlorure de sodium	05g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml
	pH =7,3
Gélose Mueller-Hinton.....	
Infusion de viande de bœuf	300g
Hydrolysate de caseine	17.5g
Amidon	01.5g
Agar	17g
Eau distillée	1000ml
	pH =7,4
Gélose viande-foie	
Extrait de viande	10 g

Annexe 01 (suite)

Peptone	20 g
Extrait de levure	10 g
Glucose	05 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
	pH = 7,6

Gélose Sabouraud.....	
Glucose	40 g
Peptone	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
	pH = 7

Gélose à esculine	
Extrait de viande	3,0 g
Peptone de viande	5,0 g
Esculine	1 g
Citrate de fer (III)	0,5 g
Agar-agar	14,5 g
	pH = 7

Milieu Mossel de base	
Extrait de viande	01g

Annexe 01 (suite)

Peptone	10g
D-Mannitol	10g
Chlorure de sodium	10g
Rouge phénol	0.025g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH =7,2-/+0.2

Emulsion de jaune d'œuf

Dans un flacon stérile, récupérez le jaune d'œuf- après avoir flambée la coquille avec de l'alcool pendant 30 secondes- ensuite ajoutez 4 fois le volume en eau distillée stérile ,mélangez rigoureusement puis mettre le mélange à l'étuve pendant 2 heures à 30°C ensuite au réfrigérateur pendant 24 heure.

Le milieu Mossel au jaune d'œuf

Milieu Mossel de base **90 ml**

Emulsion de jaune d'œuf 10ml

Gélose à amidon

Gélose nutritive **100ml**

Amidon **01g**

Gélose au lait

Lait écrémé poudre **05g**

Agar **01g**

Annexe 01 (suite)

Eau distillée	100ml
Milieu pour mettre en évidence la dégradation du Tween 80	
Peptone	10g
Chlorure de sodium	05g
Chlorure de calcium.....	0.1g
Agar	25g
Eau distillée	1000ml
10 gouttes du Tween 80 autoclavé sont ajoutées à 25 ml du milieu spécifique.....	

Milieus liquides

Milieu KN	
Extrait de levure	02g
Peptone	02g
NH ₄ Cl.....	01g
KH ₂ PO ₄	03g
K ₂ HPO ₄	03g
Chlorure de sodium	02g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.1g
MgCl ₂ , 6H ₂ O	0.5g
KCl.....	0.1g
Eau distillée	1000ml

pH =7

Annexe 01 (suite)

Milieu Pringsheim	
Extrait de levure	0.5g
MnSO ₄	0.2g
Chlorure de sodium	30 g

pH =7

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

pH = 7,2 ± 0,2.

Eau physiologique	
Eau distillée	1000ml
Chlorure de sodium	9g

Nitrate bouillon	
Peptone	5 g
Extrait de bœuf	3 g
KNO ₃	1 g
Eau distillée	1000ml

pH =7

Annexe 01 (suite)

Le bouillon est réparti dans des tubes contenant la cloche de Durham inversé, et les autoclaves à 121 ° C pendant 20 min.

Les réactifs

Réactif A : Solution d'acide sulfanilique

Acide sulfanilique 8 g

Acide acétique 5N 1000ml

Conserver le réactif A à température ambiante pendant 3 mois, dans l'obscurité.....

Réactif B : Solution α -naphtylamine

N, N-diméthyl-1-naphtylamine 6 g

Acide acétique 5N 1000ml

Réactif B Conserver entre 2 et 8 ° C pendant 3 mois, dans l'obscurité

Annexe 02 : Résumé des normes pour la description de nouveaux taxons de bactéries aérobies formant des endospores selon Logan *et al.* (2009a).

Caractéristiques essentielles	Recommandations
<p align="center">Morphologie microscopique</p> <p>La taille des cellules (largeur et longueur), la forme générale, forme des extrémités des cellules, des chaînes, des filaments. Réaction de Gram de la culture jeune. Type de motilité Présence d'inclusions de stockage La morphologie des sporanges La morphologie de la spore La position sporanges Présence de corps parasporaux et autres inclusions ou dépôts extracellulaires. Microphotographie de sporanges</p> <p>Morphologie macroscopique Milieu de croissance utilisé Les conditions de culture (température, pH, salinité, le temps d'incubation) Diamètre et forme des colonies après la période d'incubation, la morphologie des bords, texture de la surface, la couleur.</p> <p>Caractères physiologiques Milieu de croissance recommandé Optimum, maximum et minimum de la température de croissance Optimum, maximum et minimum du pH de croissance Besoins en oxygène * Tolérance au NaCl ou exigence (concentrations minimum, optimum et maximum), ou la stimulation de la croissance en présence du NaCl Catalase Oxydase Les besoins nutritionnels spéciaux</p> <p>Caractères biochimiques La production de gaz à partir du D-glucose</p> <p>Hydrolyse de la caséine, de la gélatine et de l'amidon</p> <p>Utilisation du citrate</p>	<p>La flagellation (par coloration flagellaire ou la microscopie électronique)</p> <p>Capacité à croître sur un milieu minimal (composition et conditions) Production d'acide à partir du D-glucose. Production d'acide à partir du L-arabinose, le D-mannitol, le D-xylose et d'autres hydrates de carbones spécifiés. Réaction de Voges-Proskauer.</p> <p>Hydrolyse de l'esculine et de l'urée.</p>

Annexe 03 : Tableau de lecture API 20 E.

Tests	Composants actifs	Réactions /Enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl- βD-galactopyranoside	β-galactosidase (OrthoNitroPhényl- βD-Galactopyranosidase)	incolore	jaune
ADH	L -arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange /rouge
LDC	L -lysine	Lysine Décarboxylase	Jaune	Orange /rouge
ODC	L-ornithine	Ornithine Décarboxylase	Jaune	Orange /rouge
CIT	Trisodium citate	Utilisation du CITrate	Vert pale-jaune	Bleu-vert-bleu
H₂S	Sodium thioisulfate	Production d' H₂S	Incolore-grisâtre	Dépôt noir-fin liseré
URE	Urée	UREase	Jaune	Orange /rouge
TDA	L-tryptophane	TriptophaneDésAminase	Jaune	TDA immédiat Marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	Production d'INDole	Incolore-vert pale –jaune	JAMES immédiat Rose
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoïne	Incolore – rose pale	VP1+VP2/10min Rose -rouge
GEL	Gélatine (origine bovine)	Hydrolyse (protéase) (GELatine)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment
GLU	D-glucose	Fermentation -oxydation (GLUcose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
MAN	D-mannitol	Fermentation -oxydation (MANnitol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
INO	Inositol	Fermentation -oxydation (INOsitol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
SOR	D-sorbitol	Fermentation -oxydation (SORbitol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
RHA	L-rhamnose	Fermentation -oxydation (RHAmmose)	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
OX	Voir notice du test oxydase	Cytochrome oxydase	Voir notice du test oxydase	

Annexe 04 : Tableau de lecture des zones critique d'inhibition selon **Bauer *et al.* (1966)**.

Antibiotiques	Charge du disque	Diamètre de zone d'inhibition (mm)		
		Résistante < or = mm	Intermédiaire mm	Sensible = or > mm
Amoxicilline/acide clavulanique	20/10	13	14-17	≥18
Pénicilline/novoboïcine	10/30	18	19-24	25
Oxacilline	5	9	10-13	14
Cefotaxime	30	15	16-20	21
Gentamicine	10	12	13-17	15
Kanamycine	30	13	14-17	18
Tobramycine	10	12	13-17	15
Pristinamycine	15	14	15- 18	19
Rifampine	30	13	14-17	18
Fosfomycine	10	14	15-19	20
Chloramphenicol	30	12	13-17	18

Annexe 05 : Préparation des révélateurs chimiques de la chromatographie sur couche mince.

- **Ninhydrine** : révélateur des amines, acides aminés et les osamines :

Ninhydrine : 0.2g

Acétone : 100ml

- **Chlorure de fer ferreux (FeCl₃)** : réactif des phénols

Mélanger 1% du **FeCl₃** dans un mélange de méthanol/eau (50/50 v/v).

- **Révélateur de Molish** : réactif des sucres qui donne une coloration violette après réaction avec les glucides, pour 100ml :

-0,25 g d'a-naphtol

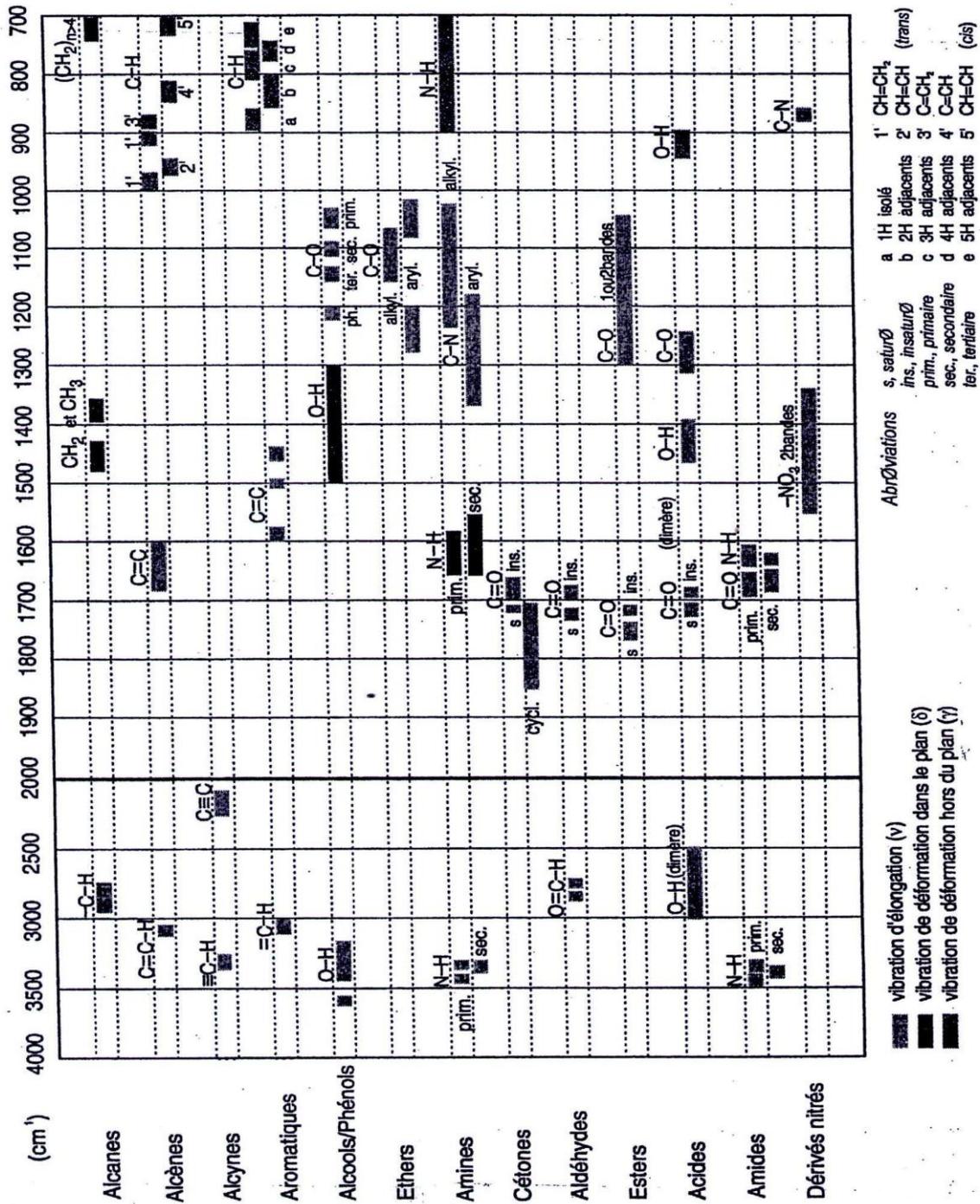
-50 mL d'éthanol

-50 mL d'acide sulfurique à 20%

Annexe 06 : Quelques propriétés physico-chimiques des solvants organiques utilisés dans le travail.

Propriétés physico-chimiques	Solvants organiques			
	Méthanol	Ether diéthylique	Acétate d'éthyle	Chloroforme
Formule chimique	CH ₃ OH	C ₄ H ₁₀ O	C ₄ H ₈ O ₂	CHCl ₃
Masse molaire	32,042	74,12	88,12	119,378
Densité	0,7863725	0,71	0,9	1,4797025
Point d'ébullition	64,546	34,6	77,1	61,178
Tension de vapeur	16,93725	587		25,9725
Cahaleur de vaporisation	37,4325	34,6	9,3à11,3	33,3520
Taux d'évaporation	2,10	-	6,1	10,20
Viscosité	0,553125	0,23	-	0,535725
Tension superficielle	22,3025	-	-	26,5325
Δd	15,1	-	-	17,8
Δp	12,3	-	-	3,1
δh	22,3	-	-	5,7
Constante diélectrique	32,6625	4,3	6,0	4,80620
Point d'éclair	11	-40	-4	16

Annexe 07 : Tableau de corrélation dans le moyen infrarouge entre les groupes fonctionnels et les bandes d'absorption.



Annexe 08 : Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar (FDR)

1. La FDR doit être remplie conformément à la *Note explicative et mode d'emploi pour remplir la Fiche d'information sur les zones humides Ramsar* ci-jointe. Les rédacteurs sont vivement invités à lire le mode d'emploi avant de remplir la FDR.

2. La FDR remplie (et la ou les carte(s) qui l'accompagne(nt)) doit être remise au Bureau Ramsar. Les rédacteurs sont instamment priés de fournir une copie électronique (MS Word) de la FDR et, si possible, des copies numériques des cartes.

1. Nom et adresse du rédacteur de la FDR:

Dr. Ammar Boumezbeur, Direction générale des forêts, Chemin Doudou Mokhtar, Ben Aknoun, Alger, Algérie. Télécopie 213 21 91 52 86 Email boumezfr@yahoo.fr

Ould Ahmed Youçef, Conservation des forêts de Ghardaïa, BP. 398, Ghardaïa, Algérie.

Siga Ahmed, Président de l'Association pour la Science et la Protection de l'Environnement, Musée d'El Goléa, Wilaya de Ghardaïa, 47.300 Ghardaïa, Algérie

2. Date à laquelle la FDR a été remplie ou mise à jour: 4 Octobre 2006

3. Pays: Algérie

4. Nom du site Ramsar: Sebket El Melah (Wilaya de Ghardaia)

5. Coordonnées géographiques : Latitude 30°25'00''N Longitude 02°54' à 02°56'Est

6. Localisation générale :

Indiquer dans quelle partie du pays et dans quelle(s) grande(s) région(s) administrative(s) elle se trouve ainsi que la localisation de la grande ville la plus proche.

Le site est situé à 12 kilomètres d'El Meniâa (El Goléa), à 5 kilomètres de Hassi EL Gara et à 280 kilomètres au Sud-Ouest de la ville de Ghardaïa, chef lieu de wilaya.

7. Élévation: (moyenne et/ou max. & min. Mini 330 m Maxi 387m **8. Superficie:** (en hectares) 18.947

9. Brève description:

Bref paragraphe résumant les principales caractéristiques écologiques et l'importance de la zone humide. C'est une dépression endoréïque constituée de sols salés qui se compose de 2 plans d'eau, un bassin supérieur, à salinité modéré, très riche du point de vue de la diversité biologique et s'assimilant à un étang, et une sebkha, ou lac salé, dénudé dont les berges sont mangées par le sel.

10. Critères Ramsar:

Encercler ou souligner chaque Critère justifiant l'inscription de ce site Ramsar. Voir annexe II de la *Note explicative et mode d'emploi* pour les Critères et les orientations sur leur application (adoptés dans la Résolution VII.11). **3 • 4 • 6**

11. Justification des Critères mentionnés dans la rubrique 11 ci-dessus:

Justifier chaque Critère l'un après l'autre, en indiquant clairement à quel Critère s'applique la justification (voir annexe II pour des orientations sur les formes acceptables de justification).

Critère 3 :

Le site joue un rôle important pour le maintien de la diversité biologique méditerranéenne et celle du Sahara Central en abritant 2 populations avifaunistiques nicheuses, le Fuligule nyroca (*Aythya nyroca*) et le Tadorne casarca (*Tadorna ferruginea*).

Le site composé de 2 plans d'eau libre, le premier à eau douce et le deuxième à eau salée, présente plusieurs habitats qui accueillent des reptiles aquatiques (coluber), des batraciens, des insectes et des poissons autochtones. Sa forêt humide de *Tamarix gallica* est un habitat pour poissons, crustacés, oiseaux, insectes et reptiles. Les monticules et les dunes de l'Erg Occidental sont l'habitat de reptiles, de mammifères (*Gerbillus sp.*, *Psammomys sp.* et *Canis sp.*) et d'insectes. La végétation du bassin supérieur est riche en Procaryotes et en Eucaryotes, des algues et des phanérogames. Le bassin inférieur, notamment en amont dans sa partie inférieure, contient une végétation réduite composée de phanérogames, notamment des graminées et des Algues halophiles en nombre réduit. Les îlots, les phragmites et les Tamaris constituent l'habitat de nidification privilégié de l'avifaune.

La diversité avifaunistique est importante : 110 espèces recensées sur ce site se répartissent en 30 familles à exigences écologiques très différentes, Anatidae, Ardeidea, Scolopacidae, Rallidae et Charadriidae sont les plus représentatives.

Critère 4 :

C'est un site d'importance internationale parce qu'il abrite une importante population animale, le Fuligule nyroca (*Aythya nyroca*) nicheur, avec un effectif supérieur de 5 fois au 1% international de la population méditerranéenne. Cette espèce est classée sur la Liste rouge de l'UICN en troisième position des anatidés menacés après l'Erismature à tête blanche (*Oxyura leucocephala*) et la Sarcelle marbrée (*Marmaronetta angustirostris*).

L'avifaune, très diversifiée, est constituée de 110 espèces nicheuses, hivernantes et de passage, 22 des espèces recensées (annexes 1, 2 et 3) se reproduisent sur le site ou dans ses environs immédiats. 43 y hivernent et 40 utilisent le site comme halte migratoire tant à l'aller qu'au retour. L'originalité de cette avifaune est sans conteste marquée par la nidification et l'hivernage du Fuligule nyroca (*Aythya nyroca*) avec des effectifs importants pour une espèce à répartition irrégulière. La présence du Tadorne casarca (*Tadorna tadorna*) est aussi importante, l'espèce paraît sédentaire sur le site où elle se reproduit avec succès (1 nichée de 11 poussins observée en avril 2004). La configuration du plan d'eau en plusieurs bassins avec de petites remises entourées de scirpaies, de jonchaies, de typhaies et de roselières reste une garantie de quiétude pour ces oiseaux et d'autres comme la Foulque macroule (*Fulica atra*) et

la Gallinule-poule-d'eau (*Gallinula chloropus*) qui nichent sur le site (nichées observées en avril 2004) sont présentes avec des effectifs importants. Cette végétation permet également d'accueillir 2 oiseaux palustres, la Rousserolle effarvate (*Accrocephalus scirpaceus*) et l'Hypolaïs pâle (*Hippolais pallida*) en nidification. La présence de petits monticules sablonneux émergeant à l'intérieur de l'eau sert à la nidification de plusieurs couples d'Echasse blanche (*Himantopus himantopus*) alors que les rivages caillouteux du bassin inférieur sont occupés par le Gravelot à collier interrompu (*Charadrius alexandrinus*). Parmi les hérons, le Blongios nain (*Ixobrychus minutus*) trouve ici des conditions idéales pour l'hivernage, le passage en migration et la reproduction. Toutes ces espèces trouvent sur le site la nourriture nécessaire et suffisante pour élever leurs poussins, les eaux douces riches permettant le développement de Potamos (*Potamogeton sp.*) et de nombreux invertébrés et vertébrés aquatiques. En effet les petites mares regorgent de larves d'insectes et de têtards de grenouilles et de crapauds. La décomposition de la végétation aquatique est accélérée sous les températures chaudes alimentant ainsi la dynamique de fonctionnement de l'écosystème. C'est la grande productivité écologique de cet écosystème qui explique le stationnement et la nidification avec succès de ces nombreuses espèces.

Critère 6 :

Sur la base des calculs des recensements hivernaux moyens des 5 derniers dénombrements les plus récents (1998, 1999, 2002, 2003 et 2004), le site a accueilli des effectifs supérieurs à 1% de la population régional du Tadorne casarca (*Tadorna ferruginea*) (moyenne de 43 oiseaux : 1,43% de la population biogéographique), et du Fuligule nyroca (*Aythya nyroca*) (moyenne de 73 oiseaux : 2,42% de la population biogéographique). Trois nichées de nyroca et 1 nichée de Casarca ont été observées en mars 2004.

الملخص

البحيرات العلية الملوحة هي مثال نموذجي لإبواء الكائنات المهجربة المقاومة للملوحة والتي تعطى خصائصها المدهشة وتكشف عن قدراتها في ميدان التكنولوجيا الحيوية. عملنا هذا يدخل في هذه المنهجية القليلة الاستغلال في الجزائر ويمكننا أن نقسمه إلى قسمين الأول يتمثل في دمج الدراسة الفينوتيبية مع التحليل الفيلوجيني المتمثل في تحليل ARNr16S من أجل معرفة مكان الخلية البكتيرية **ML9831** الآتية من بحيرة مالحة و ملوثة وهي بحيرة EL Goléa.

القسم الثاني يتمثل في تسليط الضوء على إنتاج المركبات المضادة للميكروبات من هذه البكتيريا عن طريق عدة تقنيات مع تحديد أفضل بيئة الإنتاج واستخلاص أفضل المذيبات واختبارها ضد البكتيريا والفطريات. كما تمت بداية تحديد نوعية هذه المركبات عن طريق تقنية الفصل الكروماتوغرافي والتحليل بواسطة الأشعة ما تحت الحمراء.

فقد بينت النتائج أن **ML9831** هي ببكتيريا جديدة تتبع إلى عائلة *Bacillaceae* بنسبة 96% وهي قريبة من الخلية البكتيرية *Filobacillus milosensis* و *Bacillus haloalkaliphilum* بنسبة 95% الدراسة الفينوتيبية أثبتت أن **ML9831** تختلف عن سابقتها في عدة خصائص مما أكدت نتائج تحليل ARNr16S.

النتائج الأولية لدراسة نتاج المركبات المضادة للميكروبات أثبتت أن لها تأثير مضادات الميكروبات ضد إيجابية الجرام و ضد *P. aeruginosa* كبكتيريا السلبية الغرام و لم يتم الكشف عن أية تأثير ضد *Candida albicans*.

و تم الكشف بواسطة بطارية من المذيبات العضوية المختلفة القطبية من اختيار مستخلص الكلوروفورم كأفضل مذيب لاستخلاص الجزيئات المضادة للجراثيم التي تنتجها هذه السلالة من Bouillon nutritif. وأظهر مستخلص الكلوروفورم نشاط معاد للسلالات البكتيرية المختبرة وكذا ضد *Cladosporium* وتأثير طفيف ضد *Candida albicans*.

كما كشفت تقنية الفصل الكروماتوغرافي عن وجود مركب واحد ذو طبيعة فينولية و ببتيدية. هذه النتائج تم تأكيدها بواسطة التحليل عن طريق الأشعة ما تحت الحمراء.

الكلمات المفتاحية: سلالة جديدة, *Bacillus*, رسخة, غير عادية, المتحملة للملوحة, الجزيئات المضادة للميكروبات

Résumé

Les lacs hypersalins constituent un exemple typique d'environnements extrême abritant des microorganismes résistants aux fortes salinités leurs conférant ainsi des caractéristiques étonnantes révélant un véritable atout biotechnologique. Notre travail rentre dans cette optique peu exploitée en Algérie, et peut être divisé en deux parties : le premier concernait à faire des approches culturelles en combinaison avec des méthodes moléculaires qui consistait en un séquençage de l'ARNr16S, afin de positionner une souche bactérienne nommée **ML9831** isolée à partir d'un lac hypersalin et pollué : le lac d'EL Goléa.

Le second consistait à mettre en évidence les activités antimicrobiennes par cet isolat, par différentes techniques de screening primaire et secondaires tout en choisissant le meilleur milieu de production et le meilleur solvant d'extraction. Un début de caractérisation de ces activités a été entamé en utilisant la chromatographie sur couche mince en gel de silice et une analyse par l'infra-rouge.

Les résultats des analyses phylogéniques ont conduit que l'isolat nommée **ML9831** est un nouveau taxon au sein de la famille des *Bacillaceae* (avec 96% de similitude). La souche est proche *Filobacillus milosensis* et de *Bacillus haloalkaliphilum* avec 95% de similitude. L'étude phénotypique a montré des différences entre la **ML9831** et les deux souches qui lui sont proche et n'a fait que confirmer les résultats du séquençage de l'ARNr 16S.

Le screening primaire a révélé que la souche **ML9831** est active les bactéries à Gram positives et seulement contre *Pseudomonas aeruginosa* pour les bactéries à Gram négatives et aucun pouvoir n'a été décelé contre *Candida albicans*. Le screening secondaire nous a permis de choisir le chloroforme comme le meilleur solvant d'extraction à partir du bouillon nutritif. L'extrait chloroformique a montré une activité envers les souches bactériennes testées, contre *Cladosporium spp.* et un léger pouvoir inhibiteur contre *C. albicans*. La technique de la chromatographique sur couche mince en gel de silice a révélé la présence d'une seule molécule et la révélation chimique nous a indiqué la présence des composés phénoliques et peptidiques. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse spectrale infra-rouge.

Mots clés : Nouveau taxon, *Bacillus*, sebkha, extrémophile, halotolérante, molécules antimicrobiennes.

Abstract

Hypersaline lakes are a typical example of extreme environments, which shelter halophilic microorganisms adapted to resist in high salinity confers them surprising characteristics, what reveals a real biotechnological trump. Our work falls into that untapped optical in Algeria, and can be divided into two parts: the first related to cultural approaches in conjunction with molecular methods which consisted of a 16S rRNA sequencing to position a bacterial strain named **ML9831** isolated from a polluted and hypersalin lake El Golea.

The second was to highlight the antimicrobial activities by this isolate, by various techniques of primary and secondary screening while choosing the best production media and the best solvent of extraction. A beginning of characterization of these activities was initiated using thin layer chromatography on silica gel and analyzed by infrared.

The results of phylogenetic analyzes have led that the isolate named **ML9831** is a new taxon in the family of *Bacillaceae* (with 96% similarity). The strain is close to *Filobacillus milosensis* and *Bacillus haloalkaliphilum* with 95% similarity. The phenotypic study showed differences between the **ML9831** and two strains that are near and has only confirmed the results of 16S rRNA sequencing.

The primary screening showed that the strain **ML9831** has an antimicrobial effect against Gram-positive and only against *Pseudomonas aeruginosa* for Gram negative and no power was detected against *Candida albicans*. The secondary screening allowed us to choose the chloroform as the best extraction solvent from the nutrient broth. The chloroform extract showed activity against the bacterial strains tested, against *Cladosporium spp.* and a slight inhibitory effect against *C. albicans*. The technique of thin-layer chromatography silica gel revealed the presence of one molecule and the chemical revelation we indicated the presence of phenolic and peptidic compounds. These results were confirmed by infrared spectral analysis.

Key words : New taxa, *Bacillus*, sebkha, extremophile, halotolerant, antimicrobial molecules.