

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Université de Tlemcen - Faculté des sciences de la nature et de la vie  
et 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

## **MEMOIRE DE MASTER**

**Filière : biologie Moléculaire et cellulaire**

**Option : *Microbiologie***

*Présentée par*

**BENABDALLAH AHMED MEHDI**

### **Thème**

Screening de souches extrêmophiles halophiles du genre  
*Bacillus* de la Sebka D'Oran (caractérisation  
phénotypique)

Soutenue le : **24 / 06 / 2014**

*Devant le jury :*

**Dr. REBIAHI Sid AHMED**

*maitre de conférences classe B*

*Président*

**DR.KHELIL Nihel**

*maitre de conférences classe A*

*Promotrice*

**Mr GHELIAI Lotfi**

*maitre-assistant chargé de cours*

*Examineur*

## Table de matières

Liste des figures

Liste des tableaux

<b>I- Introduction.....</b>	<b>9</b>
<b>II-Synthèse bibliographique.....</b>	<b>14</b>
1. Les microorganismes extrêmophiles.....	15
1.1 Microorganismes halotolérants et halophiles.....	17
1.2 Les micro-organismes psychrophiles .....	18
1.3 Les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles.....	19
1.4 Les micro-organismes piézophiles.....	20
1.5 Les micro-organismes acidophiles.....	21
1.6 Les micro-organismes alcalophiles.....	21
2. Environnements salins et hypersalins.....	22
2. 1. Environnements thalassohalins.....	23
2. 2. Environnements athalassohalins.....	23
2.3. Sols salés :.....	24
3. Diversité phylogénétique des halophiles .....	25
3.1. Eucaryotes halophiles :.....	25
3.2. Archaea halophiles :.....	25
3.3. Bactéries halophiles :.....	26
3.3.1. Phylum Proteobacteria :.....	27
3.3.2. Phylum Firmicutes :.....	27
3.3.3. Phylum Actinobacteria.....	28
3.3.4. Phylum Spirochétés .....	28
3.3.5. Phylum Bacteroidetes:.....	28
4. Adaptation de microorganismes halophiles et halotolérants à la salinité.....	29

4.1. Accumulation de KCl :.....	29
4.2. L'adaptation par production et accumulation d'osmoprotecteurs :.....	29
5. Diversité métabolique des halophiles .....	30
6. Biotechnologies des halophiles .....	31
6.1 Enzymes :.....	31
6.1.1. Amylases :.....	32
6.1.2. Protéases :.....	32
6.1.3. Xylanases :.....	32
6.1.4. Cellulases :.....	32
6.1.5. Estérases et lipases : .....	33
6.1.6. Nucléase H :.....	34
6.2. Solutés compatibles :.....	34
6.3. Production de biopolymères :.....	35
6.4. Production de $\beta$ -carotène par <i>Dunaliella</i> :.....	35
6.6. Production de sel :.....	35
6.7. Fermentation des aliments.....	35
6.8. Traitement des eaux usées salines :.....	35
6.9. Production de Biocarburants :.....	36
6.10. Biodégradation :.....	36
7. le genre <i>Bacillus</i> .....	37
7.1 Taxonomie du genre <i>Bacillus</i> :.....	38
7.2. Caractéristiques bactériologiques du genre <i>Bacillus</i> :.....	39
7.3. Ecologie du genre <i>Bacillus</i> :.....	40
7.4. Potentiels biotechnologiques de bactéries appartenant au genre <i>Bacillus</i> :.....	41
7.5. Les <i>Bacillus</i> halophiles et halotolérants :.....	42

8. Taxonomie polyphasique et notion d'espèce : .....	43
8.1. Taxonomie phénétique : .....	44
8.2. Taxonomie numérique : .....	45
8.3. Taxonomie génotypique : .....	<b>47</b>
<b>III-matériel et méthodes.....</b>	<b>49</b>
1. site étude et échantillonnage.....	50
1.1 Site d'étude : .....	50
1.2. Echantillonnage : .....	51
1.3 Isolement : .....	51
2- Identification phénotypique des isolats : .....	51
2-1 caractères microscopique et macroscopique.....	52
2.1.1 Aspect microscopique : .....	52
2-1-2 Aspect macroscopique : .....	52
2-2 caractères physiologiques : .....	52
2.2.1 Croissance à différents températures.....	52
2 2-2 croissances à différents ph.....	52
2-2-3 tolérance a la salinité .....	53
2-3 caractères biochimiques des isolats .....	53
2-3-1 Mise en évidence des enzymes respiratoires.....	53
2-3-1-1 Catalase.....	53
2-3-1-2 Cytochrome-oxydase .....	53
2-3-1-3 Nitrate réductase .....	53
2-3-2 Croissance sur le milieu mannitol-mobilité.....	54
2-3-3 le type respiratoire : .....	54
2-3-4 Le système api 20 <sup>E</sup> .....	54

2-3-5 Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires.....	55
2-3-5.1 Détermination de l'activité amylolytique.....	55
2-3-5-2 Détermination de l'activité protéolytique.....	55
2-3-5-3 Détermination de l'activité lipolytique.....	55
<b>IV- Résultats et discussion.....</b>	<b>57</b>
1- Isolements et purifications des isolats :.....	57
2- caractérisations phénotypiques des isolats :.....	57.
2-1 caractérisations morphologiques et culturales :.....	57
2-1-1 Aspect microscopique :.....	57
2-1-2 Aspect macroscopique :.....	57
2-2 Caractérisation physiologique des isolats :.....	58
2 2-1 salinités :.....	58
2.2.2. Température :.....	58
2.2.3. pH :.....	58
3- caractéristiques biochimiques des isolats .....	59
3-1 Mise en évidence des enzymes respiratoires et du type respiratoire :.....	59
3-2 Activités enzymatiques : .....	60
3- 3 Test du mannitol mobilité :.....	61
3-4 Résultats des plaques API20E :.....	62
4- Discussion :.....	63
<b>V-Conclusion générale .....</b>	<b>76</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>79</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>96</b>

## Liste des figures

<b>Figure N° 1</b> : Sources chaudes dans le Parc national de Yellowstone – USA Crédit photo : J.-L. Garcia.....	<b>18</b>
<b>Figure N° 2</b> . environnements thalassohalins <b>A</b> , Marais salants à Formentera en Espagne ( <b>Gerdey et Glansdorff, 2007</b> ) et <b>B</b> , Marais salants de l'île de Ré en France ( <b>poitevin et al., 2004</b> ).....	<b>22</b>
<b>Figure N° 3</b> . Environnement athalassohalins. <b>A</b> , la Mer Morte ( <b>sapin, 2009</b> ) et <b>B</b> , le Lac Rose Salé au Sénégal ( <b>Brechot, 2007</b> ).....	<b>23</b>
<b>Figure N° 4</b> : pseudo-sables très salés et sodiques de la lunette d'el Mabtouh (basse vallée de la Medjerda) ( <b>Hachicha, 2007</b> ).....	<b>25</b>
<b>Figure N°5</b> : sols salés et sodiques des sebkhas en Tunisie ( <b>Hachicha, 2007</b> ).....	<b>25</b>
<b>Figure N°6</b> : Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative des séquences de gènes ribosomiaux. Les groupes phylogénétiques contenant des membres halotolérants et halophiles (croissent bien à 100 g/l) sont indiqués en lignes gras ( <b>Oren, 2002</b> ).....	<b>26</b>
<b>Figure N° 7</b> : Quelques exemples de solutés compatibles ( <b>Roberts, 2005</b> ).....	<b>31</b>
<b>Figure N°8</b> : photo de la localisation de la Sebkha D'Oran (source : Google earth).....	<b>49</b>
<b>Figure N°9</b> : Photos de la sebkha d'Oran prises en mois de février Photos prises avec un appareil photo numérique : Canon Ixus 310 HS.....	<b>50</b>
<b>Figure N° 10</b> : Résultats d'observations microscopiques après la coloration de Gram (observation par microscope optique G×100 a immersion).....	<b>57</b>
<b>Figure N° 11</b> : Aspects macroscopiques des isolats sur gélose nutritive GN à 10% NaCl après 48heures d'incubation à 30°C Photos prises avec un appareil photo numérique : Canon Ixus 310 HS (zoom x2).....	<b>60</b>
<b>Figure N°12</b> : Résultats de la recherche des enzymes respiratoires et du type respiratoire..	<b>64</b>
<b>Figure N°13</b> : Résultats d'activités enzymatiques.....	<b>66</b>
<b>Figure N° 14</b> : Résultats du mannitol mobilité .....	<b>68</b>
<b>Figure N° 15</b> : Résultats des plaques API20E de quelques souches.....	<b>70</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau N° 01</b> : Différentes catégories des bactéries halophiles selon les définitions de <b>Larsen</b> (1962) et de <b>Kushner</b> (1993) .....	<b>16</b>
<b>Tableau N° 02</b> : Différentes catégories des bactéries halotolérantes ( <b>Tiqula et al., 2006</b> ).....	<b>17</b>
<b>Tableau N° 03</b> : Composition ioniques d'environnements thalassohalins et athalassohalins. <b>a, Gerday et Glansdorff, (2007) ; b Madigan et Martinko, (2006) ; c Boutaiba et al., (2011)</b> .....	<b>24</b>
<b>Tableau N° 04</b> : Classification du genre <i>Bacillus</i> ( <b>Priest et al ., 1993</b> ).....	<b>43</b>
<b>Tableau N° 05</b> : Résultats de l'aspect macroscopique des souches isolées.....	<b>58</b>
<b>Tableau N° 06</b> : Caractères physiologique (Salinité, température et pH) de croissance des souches .....	<b>61</b>
<b>Tableau N°07</b> : Résultats de la recherche des enzymes respiratoires et du type respiratoire.....	<b>62</b>
<b>Tableau N° 08</b> : résultats de la mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires .....	<b>65</b>
<b>Tableau N° 09</b> : Résultats du test mannitol mobilité.....	<b>67</b>
<b>Tableau N° 10</b> : Résultats des plaques API20E, des dix souches sélectionnées .....	<b>69</b>

# **Introduction générale**

## **I- Introduction générale :**

Les formes de vie sur Terre sont innombrables, comme les environnements qui les abritent. Jusqu'au 20<sup>ème</sup> siècle, on pensait que la vie n'était possible que dans un environnement «normal», c'est-à-dire là où les conditions sont compatibles avec la vie de l'homme. Puis, les chercheurs ont commencé à découvrir des organismes qui survivent dans des conditions hors de ces normes, dans des milieux caractérisés par des conditions physiques et/ou chimiques extrêmes (**Peduzzi et al., 2006**).

Ces êtres exceptionnels qui défient les lois de la biologie et créent la vie ou l'homme n'osait l'imaginer sont qualifiées d'extrémophiles (**Echigo et al., 2005**) et ils ne sont pas seulement tolérants à ces conditions extrêmes mais celles-ci sont requises pour leur croissance et développement (**Pikuta et Hoover., 2007**).

Il existe des extrémophiles qui prospèrent dans des biotopes combinant plusieurs conditions extrêmes, ils sont baptisés polyextrémophiles ce qualificatif englobe la résistance à des conditions physiques (par exemple la température, la pression, les radiations) et géochimiques (par exemple la dessiccation, la salinité, le pH) (**Mesbah et al., 2009**).

Selon les conditions extrêmes auxquelles les microorganismes extrémophiles sont confrontés, ils peuvent être thermophiles, psychrophiles, alcalophiles, acidophiles, piézophiles, halophiles ou halotolérants... (**Irwin et Braird., 2004**).

Les organismes qui se développent dans ces biotopes "hostiles" sont globalement qualifiés d'extrémophiles (**Costenaro, 2001**). Les premiers organismes extrémophiles isolés font partie des organismes halophiles, découverts dans un environnement qu'on croyait dépourvu de vie, d'où son nom : la Mer Morte. Ces organismes vivent dans des concentrations de sels très élevées (**Garcia, 2002**).

Depuis la découverte des microorganismes extrémophiles, les Archaea ont été les plus identifiées dans les environnements extrêmes, surtout associées à des sources thermales (**Woese**

**et al., 1978).** à ce moment, plusieurs chercheurs supposaient que celles-ci étaient d'ailleurs confinées à des écosystèmes hostiles. Les Archaea étaient même parfois considérées comme étant les seuls microorganismes pouvant survivre dans ce genre d'écosystème. Cependant, de nombreuses études ont démontré qu'il existe, dans les autres domaines de la vie (*Bacteria*, et *Eukarya*) des microorganismes qui sont également capables de survivre dans des environnements extrêmes (**Weber et al., 2004**). De plus, d'autres études ont démontré que les *Archaea* sont probablement présentes dans tous les écosystèmes de notre planète tels que les lacs (**Auguet et Casamayor, 2008**) et les rivières des régions tempérées (**Abreu et al., 2001**), les océans (**Massana et al., 2000**), le sol (**Midgley et al., 2007**) et même l'estomac des ruminants (**Chaban et al., 2006**).

L'existence de la vie dans les écosystèmes extrêmes a conduit à s'interroger sur les stratégies et les mécanismes cellulaires, moléculaires et génétiques mis en jeu par ces microorganismes atypiques pour se maintenir dans de tels milieux, et la mise en évidence d'une extraordinaire biodiversité de ces formes de vie montre.

Parallèlement, la découverte de la vie dans ces écosystèmes extrêmes a permis d'aborder la question de la vie extraterrestre (**Seckbach et Chela-Flores, 2007**). Les exobiologistes (astrobiologistes) s'intéressent à ces habitats puisque ceux-ci sont, sans doute, analogues à ceux retrouvés sur la planète Mars ou sur certaines lunes de Jupiter ou de Saturne (**Cavicchioli, 2002**).

Les capacités étonnantes d'adaptation des microorganismes extrémophiles au stress physico-chimique offrent des perspectives en termes d'application biotechnologiques et conduisent également à s'interroger sur leur capacité de produire de nouvelles substances exceptionnelles (**Irwin et Braird, 2004**).

Un domaine plus prospectif mais prometteur consiste en la caractérisation d'enzymes halophiles, permettant la mise en œuvre de biocatalyses dans des milieux où les enzymes commerciales ne possèdent que de faibles stabilités ou activités (**Feuga, 1997**).

La recherche sur les enzymes hydrolytiques des organismes halophiles a été frayée par Nordberg et Hofsten à la fin des années 60 (**Nordberg et Hofsten, 1969**). Depuis, un nombre considérable d'efforts a été consacré à l'évaluation des enzymes extracellulaires

produites par les bactéries modérément halophiles puis leur utilisation dans des processus biotechnologiques (**Ventosa et al., 1998 ; Govender et al., 2009**). La plupart des producteurs halophiles d'hydrolases a été assignée à la famille des Halomonadaceae. Elle inclue des membres producteurs de cellulases, d'amylases, de xylanases, de protéases et de lipases (**Sánchez-Porro et al., 2003a; Govender et al., 2009; Rohban et al., 2009**).

En outre, une partie des enzymes dérive de souches bactériennes isolées des lacs natronés et des marais salants provenant des environnements athallassohalins d'où leur polyextrémophilie, en raison de leur adaptation à de hautes concentrations salines et au pH alcalin. Elles sont souvent thermostables (**Moreno et al., 2009**). Ces propriétés ont fait des enzymes halophiles d'excellents candidats pour différentes applications biotechnologiques car elles pourraient catalyser des réactions dans des conditions dures, typiques de nombreux processus industriels (**Setati, 2010**).

Ces dernières années, la recherche sur la biodiversité microbienne des environnements hypersalins s'est multipliée. Le nombre des études visant une compréhension approfondie de ces écosystèmes comme le Grand lac salé, Utah (USA), la Mer Morte, les marais salants de plusieurs pays et les lacs alcalins à savoir le Lac Magadi à Kenya s'est considérablement développé (**D'Alessandro et al., 2006**).

Malheureusement, les études existant sur celle de nos habitats hypersalins restent encore timides malgré celles effectuées par (**Hacène et al. (2004)**) sur la diversité microbienne d'un lac salé situé à El Goléa et celle de (**Boutaiba et al. (2011)**) visant à examiner et à comparer les propriétés physicochimiques et biologiques des lacs salés de Sidi Ameur et Himalatt situés dans le Sud du pays.

L'objectif de ce présent travail est un screening de souches extrêmophiles (halophiles) du genre *Bacillus* de la Sebkhia D'Oran et de leur d'activités hydrolytiques extracellulaires.

Le genre *Bacillus* possède un potentiel biotechnologique important, les bactéries du genre *Bacillus* en sont un exemple prometteur. Cela est dû à leur taux de croissance et leurs sécrétions extracellulaires (**Schallmey et al., 2004**).

Le genre *Bacillus* possède aussi des capacités physiologiques extraordinaires qui lui permettent de survivre dans une large gamme d'habitats extrêmes. Il peut être thermophile, psychrophile, acidophile, alcalophiles, halotolérant ou halophile (**Awais et al., 2007**).

L'isolement des espèces du genre *Bacillus* actives à partir des écosystèmes extrêmes non ou peu exploités permet .éventuellement, la découverte de souche rares ou de nouvelles souches du point de vue taxonomique, pouvant avoir un potentiel de production élevé ou inexploité.

Et pour atteindre l'objectif voulu, ce travail de mémoire vise à

- Isolement et caractérisation phénotypique des isolats.
- Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires (amylases, protéases, Cellulases et lipases).
- Application de la taxonomie numérique pour situer nos isolats parmi les microorganismes décrits.

L'ensemble du travail a été réalisé sous la responsabilité de Dr. KHELIL N. chef d'équipe des « Extrémophiles » du laboratoire de microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'environnement (**L.A.M.A.A.B.E**), Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen.

# **Synthèse bibliographique**

## II-synthèse bibliographique

### 1. Les microorganismes extrêmophiles

La croissance et la survie d'un microorganisme sont caractérisées par plusieurs facteurs Physico-chimiques, biotiques et abiotiques. Cela signifie qu'un biotope, pour un microorganisme, est déterminé par une gamme pour chaque facteur permettant la croissance (**Kristjansson et Hreggvidsson, 1995**).

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**).

Les microbiologistes utilisent le terme « extrêmophile » 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 « extrêmodure » pour décrire les microorganismes qui peuvent survivre, mais ne croient pas dans ces environnements.

La notion d'extrêmophiles est différente de celle de la résistance aux conditions extrêmes, elle implique que les cellules se développent et fonctionnent de manière optimale dans ces conditions (**Alber et al.,2001**).

Les premiers microorganismes extrêmophiles 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 3ème domaine du vivant, celui des Archaea.

Le terme extrêmophile est le plus souvent employé pour rapporter des microorganismes procaryotes, puisque la majorité appartient au domaine des Archaea. Le règne Bacteria, et aussi présent 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 de 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**).

Les microorganismes extrêmophiles peuvent être répertoriés en plusieurs groupes, selon leurs paramètres de croissance et les conditions dans lesquelles ils existent (hautes et basses températures, valeurs extrêmes de pH, hautes concentrations de sel, hautes pressions et radiations).

### **1.3 Microorganismes halotolérants et halophiles**

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**).

Les halophiles sont un groupe de microorganismes qui vivent dans les environnements hypersalins et exigent dans beaucoup de cas la salinité pour survivre. Ils incluent une grande diversité d'organismes, comme les bactéries aérobies modérément halophiles, les cyanobactéries, les bactéries sulfo-oxydantes, les bactéries hétérotrophes, les bactéries anaérobies, les Archaea, les protozoaires, les mycètes, les algues et les eucaryotes multicellulaires. Les microorganismes qui peuvent se développer en absence aussi bien qu'en présence du sel sont qualifiés d'halotolérants et ceux qui sont capables de se développer approximativement au-dessus de 15% (p/v) (2.5M) de NaCl sont considérés comme extrêmement halotolérants (**DasSarma, 2001**).

Selon **Kushner (1978)**, beaucoup d'organismes marins sont des halophiles légers (avec 3%, p/v de NaCl en eau de mer). Les halophiles modérés se développent de façon optimale à 3-15% (p/v) (0,5-2,5M) de NaCl et les halophiles extrêmes à 25% (p/v) (4,2M) de NaCl.

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 et résumés dans le **tableau n° 1**.

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° 2.

**Tableaux N° 1 : Différentes catégories des bactéries halophiles selon les définitions de Larsen (1962) et de Kushner (1993).**

Classification de <b>Larsen (1962)</b>		Classification de <b>Kushner (1993)</b>	
<b>Catégories</b>	<b>NaCl</b>	<b>Catégories</b>	<b>NaCl</b>
Les non-halophiles	<2%	Les non-halophiles	~1%
Les halophiles légères	2 à 5%	Les halophiles légères	1 à 3%
Les halophiles modérées	5 à 20%,	Les halophiles modérées	3 à 15%
Les halophiles extrêmes	20 à 30%	Les halophiles à bord extrêmes	9 à 23%
		Les halophiles extrêmes	15 à 32%

**Tableaux N° 2 : Différentes catégories des bactéries halotolérantes (Tiquila et al., 2006).**

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

Il est difficile d'établir des limites qui définissent l'halophilisme et l'halotolérance car de nombreux facteurs comme la température, la concentration et la présence et la nature de nutriments disponibles aussi la présence des autres sels modifient considérablement la réponse des microorganismes au NaCl (Kushner, 1993 ;Ventosa et al ; 1998).comme exemple, pour l'espèce *Halomonas halophila*, concentration saline optimale de croissance est de 5% (p/v) à 22 % alors qu'elle est de 7.5% (p/v) lorsque la température varie de 32 à 42 C°(Quesada et al .,1987).

#### 1.4 Les micro-organismes psychrophiles

Les bactéries psychrophiles sont des bactéries adaptées au froid pouvant vivre dans des environnements variés : régions arctiques, glaciers pour les températures négatives, et les océans profonds pour des températures légèrement positives (aux alentours de 4°C) etc.... Selon la classification la plus répandue (D'Amico S et al ., 2006), les micro-organismes psychrophiles auraient un optimum de croissance entre 15°C et 20°C, certains pouvant se développer en dessous de 0°C. Il existerait également des bactéries dites psychrotolérantes dont l'optimum serait entre 20°C et 35°C.Aux deux pôles, ce sont les alpha-, et gamma-protéobactéries mais également les cytophagas-flavobactéries qui dominent. Les archées représenteraient jusqu'à 30 % de la population totale dont une majorité de Methanoarchaea. Les genres bactériens les plus rencontrés sont : *Alteromonas*, *Colwellia*, *Glacieola*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* et *Polaribacter*. 60 % de la surface terrestre est composée d'eaux marines à plus de 1000 mètres de profondeur ayant une température autour de 4°C. Dans ces conditions environnementales, les bactéries sont dites psychrophiles, mais peuvent être également piézophiles ; tous les genres appartiennent aux gamma-protéobactéries avec 5 genres dominants : *Photobacterium*, *Colwellia*, *Moritella*, *Shewanella* et *Psychromonas*. La caractéristique commune à toutes ces bactéries est la

capacité à produire des acides gras poly-insaturés entrant de 50 à 70 % dans la composition de la membrane cytoplasmique.

### 1.3 Les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles

Les procaryotes thermophiles et hyperthermophiles vivent à des températures optimales de croissance de l'ordre de 60°C et 80°C, respectivement. Ces micro-organismes sont retrouvés dans des habitats géothermiques naturels largement répandus sur notre planète et souvent associés à des zones tectoniques actives. Ces écosystèmes peuvent avoir une origine : (i) géothermique terrestre : la nature de l'eau va dépendre des roches traversées et elle est généralement associée à une activité volcanique ; la température de l'eau in situ sera fonction de la profondeur d'origine pour atteindre des températures inférieures à 100°C et des pH acides ou basiques à la surface de la terre. C'est le cas des sources chaudes localisées en Islande, aux Açores ou encore dans le Parc national de Yellowstone (figure 1) ; hydrothermale océanique profonde : le fluide hydrothermal jaillit au niveau du plancher océanique au travers de fumeurs noirs où le liquide sort à des températures variant de 20 à 400°C selon la localisation ; pétrolière : certains de ces gisements pétroliers sous-marins et continentaux sont situés entre 1,5 et 4 km de profondeur et présentent des températures allant de 60 à 130°C et des pH généralement neutres.



**Figure N° 1 : Sources chaudes dans le Parc national de Yellowstone – USA**

Crédit photo : J.-L. Garcia

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**).

#### **1.4 Les micro-organismes piézophiles**

Le terme piézophiles (en Grec = pression et philo = aimer) a été introduit officiellement en 1995 pour d'écrire les microorganismes barophiles en comparaison avec d'autres termes similaires utilisés pour d'écrire l'effet de la pression dans d'autres domaines tel que la piézoélectricité (**Yayanos, 1995**).

Les bactéries piézophiles sont largement représentées sur la planète. En effet, la profondeur moyenne des océans est de 3800 mètres (380 MPa) avec un maximum à 10790 mètres au plus profond de la Fosse des Mariannes où la pression atteint 110 MPa. Outre le milieu aquatique marin, il est possible de retrouver de tels micro-organismes dans les aquifères profonds, la croûte terrestre ou les réservoirs pétroliers.

Les bactéries piézophiles vivant dans des conditions abyssales océaniques (>5000 m) sont également des bactéries psychrophiles car la température moyenne à ces profondeurs est de l'ordre de 4°C. On parle donc dans ce cas de bactéries piézopsychrophiles. (**Yayanos., 1995**).

Les sources hydrothermales océaniques profondes constituent également un habitat idéal pour les bactéries piézophiles. Situées sur les dorsales océaniques, leur profondeur varie de 800 à 4000 mètres et la gamme de température s'étend de 2°C à 350°C (avec la pression hydrostatique) sur quelques centimètres. On peut donc y retrouver des thermopiézophiles. Certaines de ces souches sont apparues piézosensibles, d'autres piézotolérantes, d'autres enfin piézophiles. Ce n'est que récemment qu'une archée hyperthermophile et piézophile a été décrite (**Zeng et al., 2009**).

## 1.5 Les micro-organismes acidophiles

Les microorganismes acidophiles se développent de façon optimale à un pH égal à 2 (**Morozkina et al., 2010**), ils colonisent des environnements acides alors que les acidotolérants peuvent être isolés à partir des environnements à pH neutre (**Horikoshi., 1999**).

Les environnements où sont retrouvés les micro-organismes acidophiles ont généralement un  $\text{pH} < 4$ , et sont souvent riches en métaux lourds (fer, arsenic, cuivre, zinc, chrome...) et métalloïdes.

L'écosystème acide le plus étudié est le Río Tinto en Espagne avec un  $\text{pH} < 2$ , une longueur de 100 km de long, une concentration importante en métaux lourds et un surprenant niveau de diversité microbienne (**Fardeau, Gounant et al., 2005**).

## 1.6 Les micro-organismes alcalophiles

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**).

Les bactéries alcalophiles peuvent également être halophiles et se développer jusqu'à des concentrations en sel (NaCl) proches de la saturation (35 % de NaCl), notamment dans les lacs et déserts sodiques ou les sources alcalines. L'alcalinité du milieu ambiant est induite par la forte concentration en carbonate, mais la différence d'un milieu à un autre se situe au niveau de la salinité.

En ce qui concerne les environnements alcalins salés à fortement salés, ce sont des bassins fermés où la vitesse d'évaporation est élevée et permet d'atteindre une salinité de 35 % en NaCl pour des pH compris entre 8 et 12. Ces lacs aux couleurs pouvant aller du vert au rouge, en passant par le rose ou l'orange selon la saison et l'ensoleillement se retrouvent sur les continents américain, australien, africain, asiatique et même en Europe. La diversité microbienne retrouvée dans ces environnements est très variée mais les bactéries haloalcalophiles les plus étudiées sont les communautés productrices primaires telles que les cyanobactéries filamenteuses (*Spirulina*, *Anabaenopsis* et *Arthrospira*) ; et les bactéries pourpres anoxygéniques (*Ectothiorhodospira* et *Halorhodospira*) mais également les bactéries fermentaires anaérobies Gram positif à faible G+C %. (**Gregoire, Fardeau et al., 2009**).

Les produits de microorganismes alcalophiles, en particulier les enzymes, ont un potentiel industriel très important, essentiellement dans l'industrie alimentaire, l'industrie des détergents, du papier et des tissus (**Sarethy et al., 2011**).

Les protéases alcalines constituent un groupe très important parmi les enzymes des microorganismes alcalophiles (**Rao et al, 1998**). **Horikoshi** est le premier qui a documenté que le genre *Bacillus sp.* (La souche 221) est capable de sécréter des protéases alcalines (**Horikoshi, 1971**), ensuite, plusieurs d'autres protéases alcalines isolés à partir des autres espèces du genre *Bacillus* ont été étudiées, caractérisées et commercialisées (**Schallmeyer et al., 2004**), elles ont une grande importance grâce à leur stabilité à différentes conditions environnementales (**Kazan et al ., 2005**)

## **2. Environnements salins et hypersalins**

Deux types d'environnements peuvent avoir le sel comme facteur agissant sur les populations microbiennes ; le sol et l'eau (**Hachicha, 2007**).

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, 1999**). Les eaux marines constituent le plus grand biome sur notre planète avec une concentration en sel autour de 35g/l, et les environnements hypersalins ont été définis comme ceux ayant des concentrations salines au-dessus de celle-ci (**Oren, 1999; Gerday et Glansdorff, 2007**).

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 (**Oren, 2002a; 2002b; 2006**). Ces propriétés sont principalement définies selon la concentration totale en sel et la composition ionique (**Rodriguez-Valera, 1993; McGenity et al., 2000; Oren, 2002a; 2006**). Les environnements hypersalins sont divisés en thalassohalins et athalassohalins (**Gerday et Glansdorff., 2007**).

### **2. 1. Environnements thalassohalins**

Beaucoup d'environnements hypersalins proviennent de l'évaporation de l'eau de mer, favorisée par un écoulement restreint, une température élevée, de basses précipitations, etc. De

tels environnements aquatiques sont désignés sous le nom de thalassohalins (du grec thalasso, la mer) (McGenity et al., 2000; Oren, 2002a; 2006) (Figure 1). Leurs sels minéraux sont dans les mêmes proportions que celles contenues dans l'eau de mer, tant que les seuils de précipitation ne sont pas atteints. Les premiers sels à précipiter sont la calcite ( $\text{CaCO}_3$ ), le gypse ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), la halite ( $\text{NaCl}$ ), la sylvinite ( $\text{KCl}$ ), et enfin la carnallite ( $\text{KMgCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Litchfield et Gillevet, 2002; Grant, 2004; Gerday et Glansdorff, 2007). 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).

Les marais salants ou salines sont formés d'une série d'étangs reliés par des pipes et des canaux dans lesquels l'eau de mer est progressivement concentrée jusqu'à précipitation du chlorure de sodium qui est ensuite récolté et commercialement exploité (MacDonald et al.,1990; Antón et al., 2000).



**Figure N° 2.** environnements thalassohalins **A**, Marais salants à Formentera en Espagne (Gerday et Glansdorff, 2007) et **B**, Marais salants de l'île de Ré en France (poitevin et al., 2004).

## 2. 2. Environnements athalassohalins

Les eaux athalassohalins proviennent de la dissolution d'évaporites par l'eau, cas de la Mer Morte, du Lac Rose Salé au Sénégal et de la plupart des sebkhas situées en zones semi-

arides et arides. Ces environnements ont une composition ionique saline différente de celle de l'eau de mer (**Litchfield et Gillevet, 2002; Oren, 2002a; Roussel et al., 2008**) (Figure 2).

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 déficientes en  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  et ainsi, le système tend à générer un pH acide (**Grant et McGenity., 1998**).



**Figure N° 3.** Environnement athalassohalins. **A**, la Mer Morte (**sapin, 2009**) et **B**, le Lac Rose Salé au Sénégal (**Brechot, 2007**).

Il existe également des lacs sodés à savoir le Lac Magadi au Kenya et Wadi Natrun en Égypte (**Litchfield et Gillevet., 2002; Oren., 2002a**) (Tableau 1).

D'autres types de lacs hypersalins sont présents dans des sites exceptionnels au fond de certaines mers comme la Mer Noire, la Mer Rouge, la Méditerranée ou le golfe du Mexique.

Les compositions en sels de certains de ces lacs peuvent être exceptionnelles, comme celles de Discovery ou de Kryos au fond de la Méditerranée (sud de la Grèce) où les concentrations en magnésium atteignent 4 M (**Roussel et al., 2008**)

**Tableau N°3.** Composition ioniques d'environnements thalassohalins et athalassohalins.

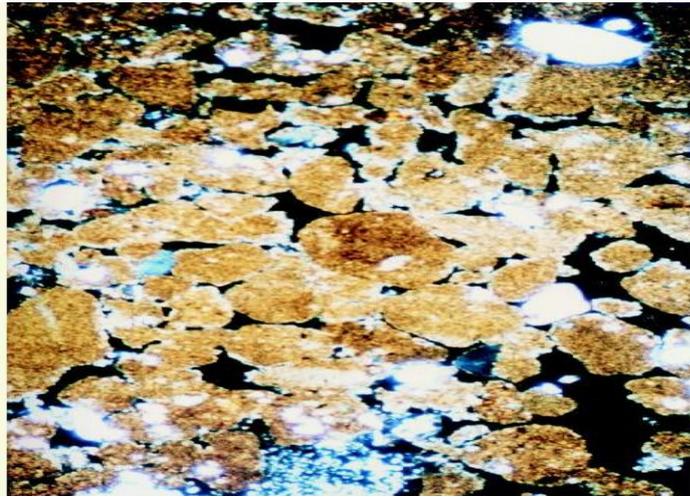
Ions	Environnements					
	Mer Morte <sup>a</sup>	Mer <sup>a</sup>	Grand lac salé <sup>a</sup> (USA)	Lac Natrun <sup>b</sup> (Egypte)	Lac Magadi <sup>b</sup> (Kenya)	Lac salé El Goléa <sup>c</sup> (Algérie)
Na <sup>+</sup>	40,10	10,60	105	142	46	107
K <sup>+</sup>	7,70	0,38	6,70	2,30	0,06	nd
Mg <sup>2+</sup>	44	1,27	11	<1	<1	0,30
Ca <sup>2+</sup>	17,20	0,40	0,30	<1	<1	0,40
Cl <sup>-</sup>	225	18,90	181	155	14	198
Br <sup>-</sup>	5,30	0,065	0,20	nd	nd	nd
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,50	2,65	27	22,60	nd	nd
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ou CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0,20	0,14	0,70	67,00	34,90	nd
pH	6,10	8,10	7,70	>11,50	>11,50	9.00

Les concentrations des ions sont en g/l ; nd, non déterminé.

**a, Gerday et Glansdorff,(2007) ; b Madigan et Martinko, (2006) ; c Boutaiba et al., (2011).**

### 2.3. Sols salés :

Les sols sont considérés comme salins lorsqu'ils contiennent un excès en sels solubles, dans la plupart comprenant les chlorures, les sulfates et les bicarbonates de sodium, de calcium et de magnésium, leur salinité est supérieure à 0.2% (p/v) (Ghasseni et al.,1995)



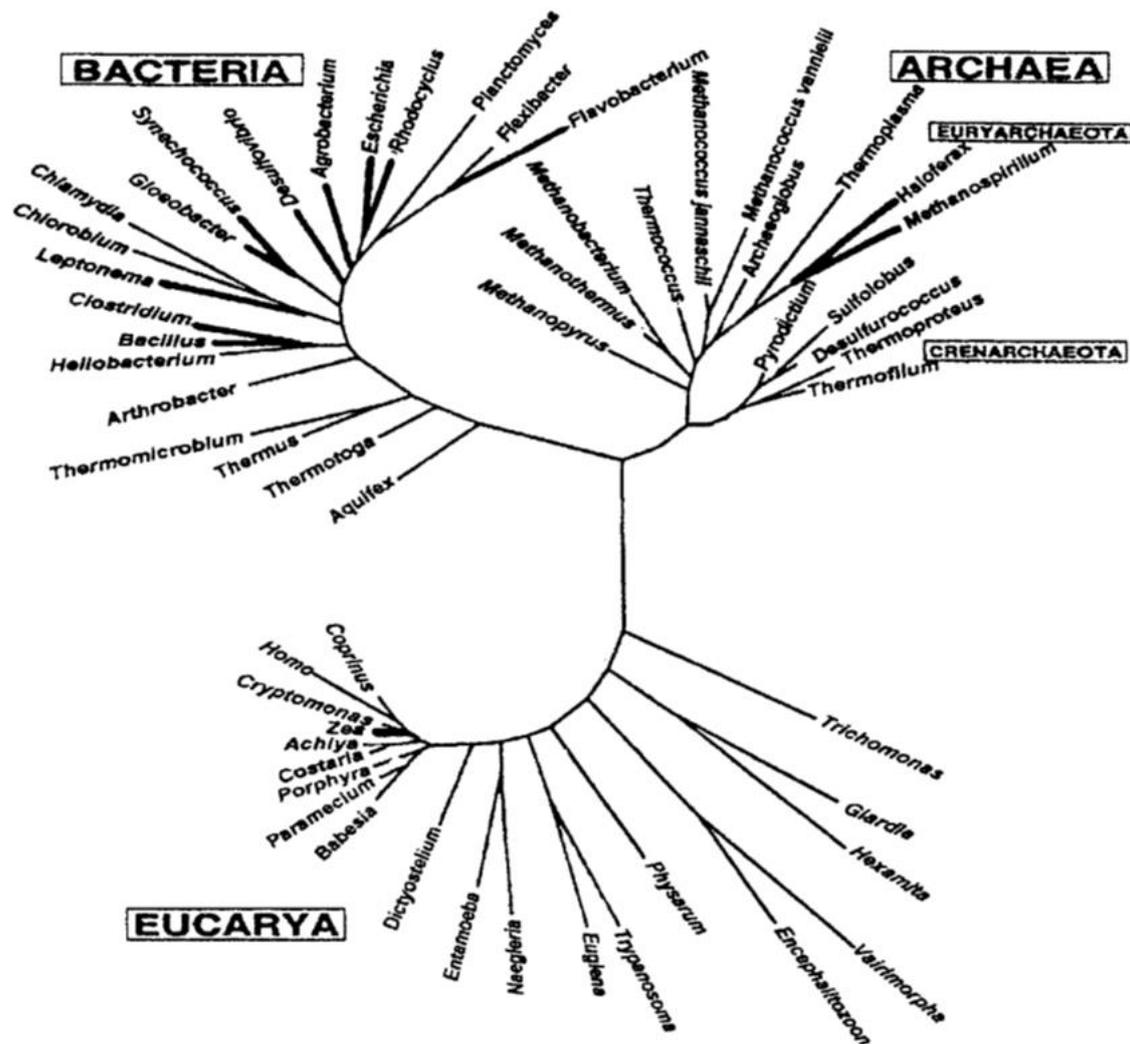
**Figure N° 4** :pseudo-sables très salés et sodiques de la lunette d'el Mabtouh (basse vallée de la Medjerda) (Hachicha, 2007).



**Figure N°5** : sols salés et sodiques des sebkhas en Tunisie (Hachicha, 2007)

### 3. Diversité phylogénétique des halophiles

Les organismes halophiles peuvent être rencontrés dans les trois domaines de la vie : Archaea, Bacteria et Eucarya (Oren., 2008) (Figure 6). L'augmentation de la salinité s'accompagne d'une réduction de la diversité des communautés microbiennes (Oren, 2002a).



**Figure N°6 :** Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative des séquences de gènes ribosomiaux. Les groupes phylogénétiques contenant des membres halotolérants et halophiles (croissent bien à 100 g/l) sont indiqués en lignes gras (Oren, 2002).

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).

### 3.1. Eucaryotes halophiles :

Dans le domaine Eucarya, les halophiles sont rares. En fait, le seul microorganisme eucaryote d'importance, et presque ubiquitaire dans les environnements à hautes concentrations en sel, est l'algue verte *Dunaliella*. Certains membres de *Dunaliella* synthétisent de grandes quantités de  $\beta$ -carotène dans des conditions appropriées, une propriété exploitée dans des opérations biotechnologiques. *Dunaliella* est halotolérante plutôt que strictement halophile : la plupart des souches se développent sur une large gamme de concentrations en sel (jusqu'à 1M). On rencontre également dans ces environnements un crustacé du genre *Artemia* (*Artemia salina*, *Artemia franciscana*) (Oren, 2002a).

Les moisissures, longtemps négligées dans la recherche des halophiles, contiennent un certain nombre de représentants halophiles faibles et modérés tels que *Cladosporium*, *Aspergillus* et *Penicillium spp.* (Gunde-Cimerman et al., 2000; 2005; Kis-Papo et al., 2003) et les levures noires *Hortaea werneckii*, *Phaeotheca triangularis* et *Aureobasidium pullulans* (Zalar et al., 1999; Gunde-Cimerman et al., 2000). Des protozoaires flagellés ont été observés dans des étangs artificiels (Cho, 2005).

### 3.2. Archaea halophiles :

Les halophiles du domaine Archaea appartiennent à trois familles : *Halobacteriaceae*, *Methanospirillaceae* et *Methanosarcinaceae*. Les deux dernières familles contiennent également des membres non halophiles (Yachai, 2009).

La famille des *Halobacteriaceae* (haloarchaea ou halobactéries) de l'ordre des *Halobacteriales* est composée entièrement de membres halophiles extrêmes et aérobies. Les représentants de cette famille se développent dans des environnements où la concentration saline est très élevée ( $\approx 5M$ ) et dont leur optimum de croissance varie de 3,4 à 4,2M (20-25%,p/v). Ils exigent la présence de sel pour leur croissance. Leur paroi cellulaire, ribosomes et enzymes sont stabilisés par l'accumulation de KCl (Yachai, 2009).

Une caractéristique physiologique intéressante est la présence, chez certaines espèces d'halobactéries, d'un photopigment membranaire (la bactériorubérine) qui permet la production d'ATP, quand la teneur en oxygène dans le milieu extérieur est trop faible. Ce composé formé d'une protéine (bactériorhodopsine) associée à un photopigment semblable à un caroténoïde (rétinal) est responsable de la couleur rouge des saumures (Oren., 2002a).

En 2009, la famille des *Halobacteriaceae* était formée de 27 genres : *Haladaptatus*, *Halalkalicoccus*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobaculum*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Halomicrobium*, *Halopiger*, *Haloplanus*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halosarcina*, *Halosimplex*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Halovivax*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronolimnobius*, *Natronomonas* et *Natronorubrum* (De la Haba et al., 2011). À l'heure actuelle, 38 genres existent avec la description de *Halonotius* (Burns et al., 2010), de *Halopelagius*, *Halolamina*, *Halorussus*, *Halogramum*, *Halobellus*, *Halorientalis* (Cui et al., 2010a; 2010b; 2010c; 2011a; Revue bibliographique 2011b), *Halomarina* (Inoue et al., 2010), *Halarchaeum* (Minegishi et al., 2010) et de *Natronoarchaeum*, *Salarchaeum* (Shimane et al., 2010; 2011).

### 3.3. Bactéries halophiles :

Les microorganismes aérobies, hétérotrophes, halophiles et halotolérants du domaine *Bacteria* forment un groupe phylogénétique très hétérogène. Ils sont inclus dans 5 phyla: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* et *Bacteroidetes*.

#### 3.3.1. Phylum *Proteobacteria* :

Le phylum *Proteobacteria* a été proposé par (Garrity et al., 2005) sur la base de l'analyse phylogénétique des séquences du gène codant l'ARNr 16S. Ce phylum contient cinq classes de bactéries à Gram négatifs : *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* (ou *Deltabacteria*) et *Epsilonproteobacteria* (Brenner et al., 2005). Les microorganismes appartenant à ce phylum sont très ubiquitaires et hétérogènes, avec des propriétés physiologiques diverses. Ils peuvent être isolés de divers environnements comprenant des habitats marins, hypersalins, alcalins et acides. La famille des *Halomonadaceae* (Franzmann et al., 1988) de la classe *Gammaproteobacteria* contient le nombre le plus important d'espèces halophiles modérées.

Ces dernières ont été isolées de plusieurs habitats différents, à savoir, les lacs hypersalins et/ou alcalins, sols salins, environnements hydrothermiques, gisements de pétrole, etc. (Kim et al., 2010).

Cette famille comprend également trois genres de bactéries halophiles extrêmes apigmentées (Maturrano, 2006; Sorokin et al., 2006a) dont une des espèces a été isolée de la sebkha Ezzemoul en Algérie (Kharroub et al., 2006a).

La famille des *Alteromonadaceae* (Ivanova et Mikhailov., 2001) inclut des *protéobactéries* halophiles modérées. Le genre *Marinobacter* (Gauthier et al., 1992) est le plus important dans cette famille.

### 3.3.2. Phylum Firmicutes :

Les membres du phylum *Firmicutes* sont hautement divers aux niveaux morphologique et physiologique et sont capables d'habiter une grande variété d'environnements, tels que les habitats hypersalins.

La famille des *Bacillaceae* appartenant à ce phylum est la plus importante avec 21 genres incluant des espèces halophiles obligatoires (Ludwig et al., 2008) dont *Halobacillus* est considéré comme le genre le plus important.

La plupart des études physiologiques réalisées sur ce genre a été focalisée sur l'espèce type, *Halobacillus halophilus*. Plusieurs approches ont démontré l'importance du chlorure non seulement pour la croissance de cette bactérie mais également pour la motilité et la synthèse flagellaire, la germination des endospores, la régulation d'une variété de protéines et le transport de l'osmoprotecteur glycine bêtaïne (Roefler et Müller., 1998; 2002; Dohrmann et Müller, 1999; Roefler et al., 2000).

### 3.3.3. Phylum Actinobacteria :

La classe *Actinobacteria* constitue l'un des principaux groupes du domaine *Bacteria* (Ludwig et Klenk., 2001) répartie en 48 familles (Zhi et al., 2009). Elle contient des bactéries halophiles incluses dans l'ordre des *Actinomycetales* (Stackebrandt et al., 1997; Zhi et al., 2009).

### 3.3.4. Phylum Spirochètes :

Quatre espèces modérément halophiles des *Spirochètes* ont été décrites, toutes appartenant au genre *Spirochaeta*. Il s'agit de *Spirochaeta halophila* (Greenberg et Canale-Parola., 1976), des espèces *holoalcaliphiles* (*Spirochaeta africana* et *Spirochaeta alkalica*) et de *Spirochaeta asiatica* (Zhilina et al., 1996).

### 3.3.5. Phylum Bacteroidetes :

Le phylum Bacteroidetes se compose de trois classes *Bacteroidia*, *Flavobacteria* et *Shingobacteria* (Garrity et Holt., 2001). Ces dernières incluent des espèces halophiles faibles et modérées (Denger et al., 2002; Donachie et al., 2004; Nedashkovskaya et al., 2005) et uniquement quatre espèces halophiles extrêmes aérobies et pigmentées: *Salinibacter ruber* (Antón et al., 2002), *Salinibacter iranicus*, *Salinibacter luteum* (Makhdoumi-Kakhki et al., 2012) et *Salisaeta longa* (Vaisman et Oren, 2009).

## 4. Adaptation de microorganismes halophiles et halotolérants à la salinité

Les microorganismes vivant en milieux salins et hypersalins rencontrent différentes difficultés qui sont la déshydratation, le stress osmotique et la faible activité d'eau, pour cela ils ont développé plusieurs stratégies adaptatives. Ils présentent de ce fait un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans ces conditions, mais aussi de se développer souvent de manière optimale.

De ce fait pour être capable de vivre à hautes concentration de sels et puisque toutes les membranes biologiques sont perméables à l'eau, les microorganismes halophiles et halotolérants doivent maintenir leur cytoplasme en iso-osmose avec le milieu extérieur. Pour atteindre cet équilibre osmotique deux stratégies existent, elles sont basées sur le principe de créer une haute pression osmotique dans le cytoplasme tout en gardant une faible concentration en ions sodium ( $Na^+$ ) (Oren, 2002), en l'expulsant grâce à un antiport  $Na^+/H^+$  localisé au niveau de la membrane cytoplasmique (Oren, 2001).

### 4.1. Accumulation de KCl :

Cette stratégie implique l'accumulation des ions  $K^+$  et  $Cl^-$  pour maintenir l'équilibre osmotique. Elle est adoptée par les archées aérobies halophiles extrêmes de l'ordre des *Halobacteriales* et par les bactéries halophiles anaérobies fermentatives ou homoacétogènes de l'ordre des *Halanaerobiales*. Cependant, la présence intracellulaire de concentrations élevées de KCl exige une adaptation supplémentaire des machineries enzymatiques, aussi les protéines devraient maintenir leur activité et leur conformation appropriées (Lanyi., 1974).

Les études de protéomique ont montré que leurs protéines sont hautement acides, et la plupart d'entre elles se dénaturent en présence de faibles concentrations en sel (Kennedy et al., 2001). Ainsi les études réalisées sur la malate déshydrogénase (Hm MalDH) d'*Haloarcula marismortui* (une haloarchaea), ont montré qu'elle contient plus de résidus acides (aspartique

et glutamique) et hydrophobes mais moins de résidus basiques (lysine) que son homologue non halophile (**Madern et al., 1995**). Cette accumulation de résidus acides est donc un mécanisme d'adaptation aux fortes concentrations en sels.

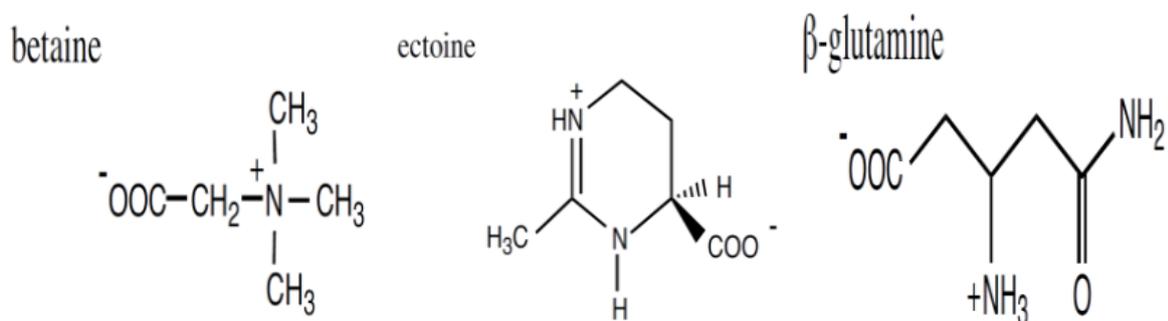
Cette enzyme est constituée de dimères reliés par un large réseau de molécules d'eau structurées dans la cavité centrale et par des ponts salins multiples aux deux extrémités. Ces derniers sont bloqués spécifiquement par des ions  $\text{Cl}^-$ , ce qui renforce leur stabilité en présence de concentrations salines élevées. De manière similaire, les ponts salins complexes entre les monomères des dimères sont fermés par des ions  $\text{Na}^+$ . Ces analyses révèlent que l'adaptation halophile ne vise pas tant à protéger la protéine des fortes concentrations en sel, mais au contraire à l'exploiter (**Costenaro, 2001**).

#### 4.2. L'adaptation par production et accumulation d'osmoprotecteurs :

Cette stratégie est basée sur l'exclusion du sodium et l'accumulation ou la production de composés organique de faible poids moléculaire solubles dans l'eau 'solutés compatibles' pour éviter la perte d'eau (**Galinski, 1993**). ce mécanisme est largement utilisé dans les trois domaines de vie *Archaea* ; *Eucarya* et *Bactéria*.

Il existe une large variété de solutés, des polyalcools et des sucres (**Galinski, 1995**), qui peuvent être synthétisés par les microorganismes ou importés de l'environnement externe, par des systèmes de transport sans qu'ils interfèrent avec leur métabolismes (**Brown, 1976**).

Les osmoprotecteur les plus utilisés dans le domaine de *Bacteria* sont l'éctoine et la glycine bétaine .l'éctoine est synthétisée par une grande variété de microorganismes halophiles et halotolérants comme les cyanobactéries, les bactéries aérobies hétérotrophe et les *Archaea* méthanogènes tandis que la glycine bétaine est synthétisée exclusivement par des procaryotes photosynthétique et accumulée à partir du milieu par des bactéries hétérotrophes (**Oren, 2008**).



**Figure N° 7** : Quelques exemples de solutés compatibles (**Roberts, 2005**).

Les microorganismes halophiles ou halotolérants utilisant le mécanisme de la production ou accumulation de solutés compatibles sont plus flexibles pour l'adaptation à la pression osmotique que les microorganismes utilisant le mécanisme de l'accumulation de KCl (**kunte et al.,2002**) également ,d'adaptation à la salinité par l'accumulation de solutés organiques nécessite moins d'adaptation de la machinerie enzymatiques intracellulaire que la stratégie de l'accumulation des ions potassium, cependant la production des solutés est énergétiquement couteuse(**Oren,2002**).

## 5. Diversité métabolique des halophiles

La diversité phylogénétique dans les environnements hypersalins s'accompagne d'une diversité métabolique. De nombreux processus métaboliques ayant lieu dans les niches écologiques à faible teneur en sel ne se produisent pas au-dessus de 100 à 150 g/l. Des exemples à cela sont donnés par la nitrification autotrophe, la méthanogénèse et l'oxydation aérobie du méthane (**Oren, 2011**).

La plupart des microorganismes halophiles et halotolérants décrits sont des hétérotrophes aérobies, trouvés dans les trois domaines de la vie. Dans les environnements avec des concentrations en sel jusqu'à 200-250 g/l, les représentants de bactéries sont responsables de la majeure partie de l'activité hétérotrophe.

Aux fortes salinités, les groupes comme les *Halomonadaceae* ne fonctionnent plus et la dégradation aérobie des composés organiques est assurée par deux groupes de procaryotes: *Halobacteriaceae* (Archaea) et *Salinibacter* (Bacteria) (**Oren, 2006**).

D'autres modes métaboliques existent aussi tels que la respiration anaérobie dont les accepteurs finaux d'électrons utilisés incluent non seulement le nitrate et le sulfate, mais aussi des composés non communs comme l'arséniate et le séléniate. Ce mode est utilisé par plusieurs membres modérément halophiles de la famille des *Halomonadaceae* (**Ventosa et al., 1998**).

Certaines Archaea halophiles (*Haloarcula marismortui*, *Haloarcula vallismortis*, *Haloferax mediterranei*) peuvent croître également de façon anaérobie sur le nitrate s'il est présent, en formant le nitrogène gazeux et/ou le protoxyde d'azote (**Mancinelli et Hochstein., 1986**).

Des halophiles fermentatifs sont inclus dans des groupes disparates. Les Archaea de la famille *Halobacteriaceae* sont fondamentalement des aérobies en utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Cependant, quelques espèces peuvent se développer en anaérobiose par la dénitrification ou en utilisant l'énergie lumineuse absorbée par la bactériorhodopsine. Les espèces du genre *Halobacterium* peuvent se développer dans des conditions anaérobies à l'obscurité tout en puisant leur énergie par fermentation de l'arginine avec la production de l'ornithine, de l'ammoniaque et du dioxyde de carbone (**Hartmann et al., 1980**).

Un autre représentant des *Halobacteriaceae* qui se développe probablement par la fermentation est *Halorhabdus tiamatea*, isolé d'un bassin anoxique hypersalin profond de la Mer Rouge. Il se développe seulement sur des substrats complexes mais aucun mode de fermentation n'a été constaté (**Antunes et al., 2008**).

La fermentation est utilisée par des halophiles fermentatifs classés principalement dans les deux familles, *Halanaerobiaceae* et *Halobacteroidaceae* (**Rainey et al., 1995**), en plus de quelques procaryotes fermentatifs du phylum *Firmicutes* (*Clostridium halophilum*) (**Antunes et al., 2009**).

## **6. Biotechnologies des halophiles**

Les organismes vivant en milieux extrême, en particulier les microorganismes, présentent un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans des conditions extrêmes, mais aussi de se développer souvent de manière optimale dans des niches écologiques extrêmes.

Les propriétés singulières de certaines de ces microorganismes ont très vite attiré l'attention des opérateurs des biotechnologies : chercheurs, ingénieurs, et entreprises pour exploiter ce nouveau gisement de ressources naturelles en biomolécules, notamment les enzymes, les biopolymères et les métabolites secondaires.

Ces dernières années un intérêt croissant est porté aux microorganismes halophiles. Leur utilisation est envisagée dans différents secteurs :

### **6.1. Enzymes :**

Par rapport à l'utilisation étendue des extrêmozymes des bactéries et des archées thermophiles et alcaliphiles, 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**).

Cependant, beaucoup d'activités enzymatiques d'archées halophiles ont été caractérisées, y compris des enzymes à intérêt potentiel, telles que les amylases, les protéases et les nucléases, avec dans la plupart des cas un fonctionnement optimal à des températures élevées. Cependant, aucune application commerciale n'a été encore développée pour de telles enzymes (**Fukushima et al., 2005**).

Plusieurs chercheurs ont également examiné les bactéries halophiles de différents environnements hypersalins par l'électrodéposition directe sur les milieux d'agar modifiés avec des substrats spécifiques pour les enzymes d'intérêt. La plupart des producteurs halophiles d'hydrolases ont été assignés à la famille des *Halomonadaceae*. Ses membres sécrètent des enzymes hydrolytiques extracellulaires comme les amylases, les protéases, les lipases, les DNases, les pullulanases et les xylanases (**Sánchez-Porro et al., 2003b; Govender et al., 2009; Rohban et al., 2009**).

Une plus grande activité hydrolytique est généralement observée pour des bactéries modérément halophiles à Gram positifs (**Sánchez-Porro et al., 2003b; Rohban et al., 2009**). Les bactéries halophiles sont métaboliquement plus versatiles que les archées, et leurs activités enzymatiques sont plus diverses. D'ailleurs, la plupart des enzymes haloarchéennes exige au moins 10 à 15% (p/v) de sel pour leur stabilité et leur activité. Alors que les enzymes bactériennes généralement ne montrent pas des exigences strictes au sel. La recherche étendue a donc été faite sur les propriétés des enzymes isolées de bactéries halophiles et leurs applications possibles (**Kamekura, 1986**).

### **6.1.1. Amylases :**

Les amylases (EC.3.2.1.x) sont des macromolécules appartenant à la classe des protéines globulaires, de type endoglycanases de la classe des hydrolases qui agissent sur les liaisons (1,4) de l'amidon. Elles catalysent la dégradation des polymères d'amidon pour produire des dextrines et différents gluco-oligosaccharides de longueurs variables. Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie actuelle (**Gupta et al., 2003**).

Cette classe d'enzymes industrielles joue un rôle important dans la dégradation d'amidon et a constitué en 2007, environ 25 à 33% du marché mondial (**Saxena et al., 2007**).

Les amylases ont une gamme étendue d'applications dans beaucoup de champs tels que les industries de la saccharification d'amidon, de textile, des aliments, de boulangerie, de brassage et de distillation (**Gupta et al., 2003**).

En raison de l'importance industrielle de cette enzyme, un intérêt est porté à l'isolement de nouvelles amylases appropriées à applications industrielles nouvelles (**Burhan et al., 2003**).

À cet égard, des amylases halophiles ont été isolées et caractérisées de diverses archées telles que *Haloferax volcanii* (**Kobayashi et al., 1994**), *Haloferax mediterranei* (**Pérez-Pomares, 2003**), *Haloarcula sp.* (**Fukushima et al., 2005**), ainsi que de plusieurs bactéries halophiles modérées à savoir *Halomonas meridiana* (**Coronado et al., 2000**), *Halobacillus sp.* (**Amoozegar et al., 2003**), *Halothermothrix orenii* (**Mitjs et Patel, 2002**; **Tan et al., 2008**), *Chromohalobacter sp.* (**Prakash et al., 2009a**) et *Nesterenkonia sp.* (**Shafiei et al., 2010**).

Ces enzymes montrent généralement de larges optima de pH et demeurent actives et stables aux températures au-dessus de 50°C et aux fortes salinités (jusqu'à 30%, p/v) (**Prakash et al., 2009b**).

### **6.1.2. Protéases :**

Les protéases hydrolysent les protéines en libérant des peptides plus petits, selon la nature de leur site catalytique elles sont classées en trois groupes: sérine-, cystéine- ou métallo-protéases (**Rambaud et al., 2004**).

Les protéases microbiennes sont l'une des classes d'enzymes les plus intensivement étudiées et largement appliquées dans les processus industriels. Elles sont généralement utilisées comme additifs 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**; **Karbalaei-Heidari et al., 2009**).

Des archées halophiles extrêmes productrices de protéases comme *Halogeometricum borinquense* (**Vidyasagar et al., 2006**) et *Natrialba magadii* (**D'Alessandro et al., 2006**) ont été isolées. De telles enzymes ont également été isolées et caractérisées de plusieurs espèces bactériennes comprenant *Bacillus sp.* (**Setyorini et al., 2006**; **Shivanand et Jayaraman, 2009**), *Pseudoaltermonas sp.* (**Sánchez-Porro et al., 2003b**), *Salinivobrio sp.* (**Amoozegar et al., 2007**), *Salicola sp.* (**Moreno et al., 2009**), *Halobacillus spp.* (**Karbalaei-Heidari et al.,**

2009), *Filobacillus sp.* (Hiraga et al., 2005), *Chromohalobacter sp.* (Vidyasagar et al., 2009), *Nesterenkonia sp.* (Bakhtiar et al., 2005) et *Virgibacillus sp.* (Sinsuwan et al., 2008).

Ces enzymes exercent une activité optimale en présence de NaCl et restent stables sur une large gamme de pH (5 à 10). Elles ont été caractérisées d'enzymes haloalcaliphiles (Gupta et al., 2005). En outre, elles sont souvent actives à des températures comprises entre 40 et 75°C (Vidyasagar et al., 2009).

### 6.1.3. Xylanases :

Les xylanases (nom systématique 1,4- $\beta$ -D-xylane xylanohydrolase, EC.3.2.1.8) sont les enzymes qui hydrolysent les liaisons  $\beta$  (1, 4) entre deux résidus  $\beta$ -D-xylanopyranoses. Elles sont utilisées dans l'industrie de boulangerie pour améliorer les propriétés de la pâte, dans le bioblanchiment de papier et de pulpe (Mamo et al., 2009). Cependant, l'application efficace des xylanases dans le bioblanchiment exige que ces enzymes soient alcaliphiles et thermotolérantes.

Les organismes halophiles sont la source la plus susceptible des enzymes avec de telles propriétés. Bien que la recherche dans cet axe soit encore limitée, seulement quelques xylanases halophiles ont été décrites. Elles incluent les enzymes dérivées des bactéries marines et hypersalines telles que *Glaciecola mesophila* (Guo et al., 2009), *Chromohalobacter sp.* (Prakash et al., 2009a) et *Nesterenkonia sp.* (Govender et al., 2009).

Une partie de ces enzymes montre une grande stabilité dans un intervalle large de pH (6 à 11) et reste active à des températures au-dessus de 60°C (Wejse et al., 2003; Guo et al., 2009; Prakash et al., 2009b).

### 6.1.4. Cellulases :

Les cellulases se distinguent des autres glycosides hydrolases par leur capacité à hydrolyser les liaisons  $\beta$ -osidiques entre les résidus glycosyliques (Lynd et al., 2002).

La majorité des cellulases microbiennes étudiées sont des glycoprotéines, avec un taux élevé en acides aminés acides (Beldman et al., 1985) et ne sont pas des métalloprotéines (Saha et al., 1994).

Elles ont généralement une structure modulaire avec deux domaines fonctionnels distincts : le site catalytique et le site de fixation du substrat, habituellement reliés entre eux par un peptide

glycosylé flexible riche en sérine, proline et thréonine appelé «linker» (**Hasper et al., 2002; Receveur et al., 2002**).

Les cellulases sont principalement utilisées dans l'industrie textile pour le bioblanchiment des tissus, aussi bien que dans les détergents de blanchisserie pour ramollir les tissus (**Aygan et Arikian., 2008**).

L'intérêt aux cellulases augmente également dans la production du bioéthanol comme les enzymes qui sont employées pour hydrolyser les matériaux cellulosiques prétraités pour les sucres fermentescibles (**Wang et al., 2009**). Actuellement, des cellulases halophiles dérivées de *Bacillus sp.* (**Aygan et al., 2008**) et de *Salinivibrio sp.* (**Wang et al., 2009**) ont été caractérisées. Elles sont thermostables et également stables à l'alcalinité et à la salinité ce qui fait d'elles des candidats idéaux pour différentes applications industrielles.

#### **6.1.5. Estérases et lipases :**

Les triacylglycérol acyl-hydrolases (EC.3.1.1.3), ou lipases, sont des enzymes atypiques par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats. En fonction du microenvironnement de l'enzyme, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. En tant qu'hydrolases, elles sont responsables du catabolisme des triglycérides en acide gras et en glycérol. Il existe deux groupes d'enzymes très connues dans la famille des hydrolases d'esters carboxyliques : les lipases et les estérases (**Ghanem., 2007**).

Les estérases se distinguent des lipases par leur préférence pour les acyl esters à chaîne courte (inférieure à 10 atomes de carbone) et ne sont pas actives sur les substrats qui forment des micelles. Elles ne requièrent pas de cofacteur, présentent une bonne chimiosélectivité, régiosélectivité et énantiosélectivité. Bien que leur rôle physiologique ne soit pas toujours connu, les estérases et les lipases ont trouvé de multiples applications dans les industries médicales et agroalimentaires, dans la production de détergent et de biodiesel, dans la synthèse d'arômes, etc. Elles constituent l'une des cibles majeures des travaux de recherche en biocatalyse et le nombre d'articles qui leur est consacré s'accroît très rapidement. Ces travaux ont montré que les réactions catalysées par les lipases sont plus sélectives et plus efficaces que beaucoup de réactions homologues en chimie organique. L'utilisation de lipases en biocatalyse asymétrique constitue une voie prometteuse pour obtenir des composés énantiomériquement purs ou enrichis (**Ghanem., 2007**).

Pour l'instant plusieurs études ont permis de révéler plusieurs activités lipolytiques dans le monde des halophiles. Les souches ont été identifiées comme membres des genres suivants : *Salicola*, *Halovibrio*, *Halomonas*, *Oceanobacillus*, *Thalassobacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Gracilibacillus*, *Salinicoccus*, *Piscibacillus* (Rohban et al., 2008), *Salinivibrio* sp. (Amoozegar et al., 2008), *Staphylococcus* (Joseph et al., 2006; Esakkiraj et al., 2010) et *Bacillus* (Ghasemi et al., 2010). Ces microorganismes produisent des lipases actives en présence de fortes concentrations salines (Rohban et al., 2008).

#### 6.1.6. Nucléase H :

Une des quelques enzymes halophiles appliquées dans les processus industriels est la nucléase H isolée de *Micrococcus varians subsp. halophilus* et utilisée dans la production commerciale de l'agent aromatisant : l'acide 5'-guanylique (5'-GMP). Cette enzyme dégrade l'ARN à 60°C et en présence de 12% (p/v) de sel (Kamekura et al., 1982).

#### 6.2. Solutés compatibles :

La plupart des microorganismes halophiles et halotolérants produisent ou accumulent dans le cytoplasme des composés organiques de faibles poids moléculaires (solutés compatibles ou osmoprotecteurs) pour l'équilibre osmotique.

Une grande variété de solutés compatibles a été identifiée dans le monde microbien. Les mieux connus sont la glycine bêtaïne, les sucres simples tels que le sucrose et le tréhalose, et différents dérivés d'acides aminés. Certains de ces solutés osmotiques ont trouvé des applications en biotechnologie (Lentzen et Schwarz, 2006).

Un des solutés osmotiques les plus communs dans le domaine des bactéries est l'ectoïne (l'acide 1,4,5,6-tétrahydro-2-méthyle-4-pyrimidinecarboxylique). Ce dernier et l'hydroxyectoïne sont actuellement produits et commercialisés. Ces molécules ont une forte action stabilisante sur beaucoup d'enzymes labiles in vitro par augmentation de la durée de vie et de l'activité des préparations enzymatiques. Cette fonction sert de base à la production commerciale d'ectoïne à partir de *Halomonas elongata* et l'hydroxyectoïne à partir de *Marinococcus* M 52 (Nagata et al., 2007).

L'ectoïne protège également la peau des altérations causées par les rayonnements ultraviolets d'où son incorporation dans les préparations de certaines crèmes à vocation hydratante (Desmarais et al., 1997; Van den Burg ; 2003).

Elle est reconnue pour augmenter les défenses immunitaires des cellules de Langerhans et la formation des protéines de choc de la chaleur (Beyer et al., 2000; Buenger et Driller, 2004). L'ectoïne empêche également l'agrégation et la neurotoxicité du  $\beta$ -amyloïde d'Alzheimer (Kanapathipillai et al., 2005).

### 6.3. Production de biopolymères :

Les biopolymères offrent sans nul doute de nombreuses opportunités en matière de nouveaux matériaux et/ou de propriétés physico-chimiques et biologiques nouvelles. Ces biopolymères bactériens présentent quelques atouts comme l'absence de dépendance vis-à-vis d'aléas climatiques, écologiques et politiques pouvant affecter la qualité, le coût et l'approvisionnement de leurs homologues extraits d'algues, de plantes ou d'animaux. Les possibilités d'agir sur les conditions de fermentation (sources de carbone, température, aération, pH, etc.) en vue d'optimiser la production, d'assurer la traçabilité, mais aussi de modifier le polymère produit, jouent également en faveur de la fermentation bactérienne. Deux types de biopolymères ressortent en termes d'applications biotechnologiques, les exopolysaccharides (EPS) et les polyhydroxyalcanoates (PHA).

Les exopolysaccharides sont produits majoritairement par des souches appartenant aux genres *Haloferax*, *Halomonas*, *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* et *Vibrio* (Rodriguez-Valera, 1992; Calvo et al., 2002; Nazarenko et al., 2003).

Les polysaccharides extracellulaires bactériens ont trouvé différentes applications en tant que gélifiants, stabilisateurs et épaississants (Calvo et al., 2002).

Le poly  $\beta$ -hydroxyalcanoate (PHA), un polymère contenant des unités de  $\beta$ -hydroxybutyrate et  $\beta$ -hydroxyvalérate, est utilisé pour la production des plastiques biodégradables (polyesters biologiques). Il a été isolé à partir d'une archée *Haloferax mediterranei* (Don et al., 2006) et d'*Halomonas boliviensis* (Gammaproteobacteria) (Quillaguamán et al., 2006; 2007).

#### **6.4. Production de $\beta$ -carotène par *Dunaliella* :**

La culture des algues vertes *Dunaliella salina* et *Dunaliella bardawil* pour la production de  $\beta$ -carotène est l'histoire principale de succès de la biotechnologie halophile (**Ben-Amotz et Avron, 1989; Raj et al., 2007**).

Le pigment  $\beta$ -carotène est en demande élevée en tant qu'antioxydant, comme source de la provitamine A (rétinol) et comme agent de coloration d'aliments. Ses activités antioxydants le rend populaire pour l'usage en aliments sanitaires (**Ye et al., 2008**).

#### **6.5. Bactériorhodopsine :**

La bactériorhodopsine est une protéine rétinienne de 25-kDa. Cette molécule unique, découverte au début des années 70, est produite par *Halobacterium salinarum* et par quelques autres représentants des *Halobacteriaceae* (**Oesterhelt., 1991**).

Cette protéine est utile dans la fabrication de biopuces pour la nouvelle génération des ordinateurs. La membrane artificielle capable de convertir la lumière du soleil en électricité peut également être une possibilité technologique (**Bullock, 2000**).

#### **6.6. Production de sel :**

La fabrication du sel par évaporation de l'eau de mer dans les salines est une technologie qui a existé pour des milliers d'années. Quand la saumure s'approche de la saturation et le sel commence à se cristalliser, les eaux salines deviennent colorées en rouge. Les communautés planctoniques des microorganismes rouges dans les étangs de cristallisation sont généralement considérées bénéfiques au procédé de la production de sel. Les pigments de caroténoïdes absorbent l'énergie lumineuse, et soulèvent de ce fait la température de l'eau, en menant à des taux accrus d'évaporation. Des études réalisées ont montré l'implication des archées halophiles dans la cristallisation de l'halite (**Davis et Giordano., 1996**).

#### **6.7. Fermentation des aliments :**

La production de certains aliments fermentés traditionnels en Extrême-Orient, tels que la sauce à poissons et la sauce de soja, implique l'activité d'une variété de microorganismes halophiles et/ou fortement halotolérants (**Oren., 2002a**).

Dans certains cas, la concentration en sel pendant le procédé de fermentation est suffisamment haute pour le développement des archées de la famille *Halobacteriaceae*. La première archée halophile obtenue à partir de la sauce à poissons ressemblait à *Halobacterium*

*salinarum* (Thongthai et McGenity, 1992), deux nouvelles espèces, *Halococcus thailandensis* et *Natrinema gari*, ont été également décrites (Tapingkae et al., 2008).

Les fermentations qui impliquent des concentrations salines faibles permettent généralement le développement des espèces de *Halobacillus*, *Lentibacillus*, *Halomonas* et d'autres genres bactériens (Lopetcharat et al., 2001).

#### **6.8. Traitement des eaux usées salines :**

Quelques processus industriels produisent de l'eau usagée fortement saline. Un de tels processus est la production du  $\beta$ -carotène par *Dunaliella* discutée ci-dessus. Après la collection des cellules par centrifugation, l'eau usagée hypersaline reste riche en matériel organique, y compris une haute concentration de glycérol.

Plusieurs processus ont été proposés pour le traitement biologique de telles eaux usagées pour enlever le carbone organique et les composés toxiques (Santos et al., 2001). Ainsi des essais de culture d'*Halobacterium salinarum* sur ces eaux sont faits par Kargi et al. (2000) et Dinçer et Kargi (2001). Mais d'autres auteurs proposent l'utilisation de bactéries halophiles telles que *Halomonas spp.* et *Bacillus spp.* (Hinteregger et Streichsbier, 1997; Kubo et al., 2001).

#### **6.9. Production de Biocarburants :**

Dans les périodes dans lesquelles les combustibles fossiles sont épuisés et le monde est en recherche de sources alternatives d'énergie, le biocarburant serait une alternative idéale. L'algue halophile *Dunaliella*, discutée ci-dessus comme une source commerciale de  $\beta$  carotène et comme source potentielle de production de glycérol, peut également être considérée comme matière première pour la production de biocarburant. La pyrolyse catalytique du matériel cellulaire de *Dunaliella* à 200-240°C produit une substance soluble au benzène comme l'huile. Le processus global s'est avéré exothermique, de sorte que la plupart de l'énergie thermique requise pour lancer la réaction peut être regagnée. Ainsi, jusqu'à 75% du matériel cellulaire d'algue marine a pu être convertie en huile extractible (Goldman et al., 1980; Ginzburg, 1991).

#### **6.10. Biodégradation :**

Les environnements salins et hypersalins sont fréquemment contaminés par des composés organiques en raison d'activités industrielles (Oren et al., 1992; Margesin et Shinner., 2001).

La contamination de ces habitats constitue un problème écologique sérieux principalement en raison de la toxicité élevée montrée par quelques composés organiques. Dans la plupart des cas, la biodégradation constitue le mécanisme principal pour se débarrasser des contaminants. Cependant, les programmes de biodégradation sont difficiles à être exécutés sous des conditions salines (**Oren et al., 1992**). Une alternative pour surmonter ce problème, est l'utilisation des bactéries halophiles adaptées à ces conditions. Plusieurs études ont montré la dégradation bactérienne des composés aromatiques en conditions salines (**Piedad Diaz et al., 2000; Margesin et Shinner, 2001; Mellado et Ventosa, 2003; Peyton et al., 2004**). Des archées halophiles appartenant aux genres *Halobacterium* sont capables de métaboliser les hydrocarbures (**Kulichevskaya et al., 1992**). La souche *Haloferax sp. D1227* est la première archée rapportée capable de dégrader les acides aromatiques comme l'acide benzoïque, l'acide cinnamique et l'acide 3-phénylpropionique (**Emerson et al., 1994**). Une souche archéenne halophile nouvelle (*Haloarcula sp.D1*), est trouvée capable de se développer en conditions aérobies sur l'acide 4-hydroxybenzoïque comme source unique de carbone et d'énergie (**Fairley et al., 2002**).

D'autres espèces halophiles nouvelles telles que *Marinobacter spp.*, *Erwinia ananas*, *Bacillus spp.* (**Díaz et al., 2000; 2002**), *Cellulomonas spp.*, *Bacillus marisflavi*, *Dietzia maris*, *Halomonas eurihalina* (**Riis et al., 2003**), aussi bien que des bactéries des familles *Ectothiorhodospiraceae* et *Methylophilaceae*, ont été reportées comme capables de dégrader des hydrocarbures et quelques composants de pétrole brut (**Kleinstauber et al., 2006**). L'utilisation de phénol par des espèces bactériennes modérément halophiles comme *Halomonas organivorans* et *Thalassobacillus devorans* a également été décrite (**Alva et Peyton, 2003; Garcia et al. 2004; 2005**).

## **7. le genre *Bacillus***

### **7.1 Taxonomie du genre *Bacillus* :**

Le genre *Bacillus* est ubiquiste dans la nature, il appartient à la famille des *bacillaceae*, ordre des *bacillales*, classe des *bacilli*, phylum des *firmicutes*. Depuis qu'il a été établi par **cohn en 1872**, le nombre d'espèces n'a pas cessé de fluctuer. la première étude taxonomique complétée sur le genre *Bacillus* a été publiée par (**smith et al., 1952**), elle est basée sur une comparaison entre 1134 isolats représentant plus de 150 espèces.

De nombreuses espèces initialement décrites comme *Bacillus* ont été transférées à des genres apparents. Néanmoins, le genre *Bacillus* est toujours considéré comme l'un des plus grands genres et comprend plus de 200 espèces (Zhang et al., 2009).

La classification taxonomique des bactéries du genre *Bacillus* a été auparavant sur leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques ainsi que leur capacité à sporuler (Bron et al., 1999) alors qu'aujourd'hui la classification se base sur l'analyse comparative des séquences de base de l'ARNr 16S (Maghan et Van der Auwera., 2011).

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.

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

Groupes	Espèces représentantes	Caractéristiques
Groupe I	<i>B. polymyxa</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. subtilis</i> , <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 $\beta$ -glucanases et protéases.
Groupe III	<i>Brevibacillus brevis</i>	Taxonomiquement moins définis.
Groupe IV	<i>B. sphaericus</i> , <i>B. insolitus</i> , et <i>B. psychrophilus</i> .	Groupe phylogénétiquement homogène. Tous aérobies stricts. Méso-diaminopimélique du peptidoglycane est remplacé par de la lysine ou de ornithine.
Groupe VI	<i>B. stearothermophilus</i>	Thermophiles. Groupe physiologiquement et morphologiquement hétérogènes. Métabolisme diverses allant de la aérobies stricts à des types microaérophiles.
Groupe VII	<i>Alicyclobacillus</i> (genre)	Thermophiles acidophiles.

## 7.2. Caractéristiques bactériologiques du genre *Bacillus* :

Le genre *Bacillus* représente un groupe hétérogène de bactéries en forme de bâtonnets droit ou légèrement incurvées, à gram positif avec des extrémités arrondies, à l'exception des membres du *Bacillus cereus* qui possède des extrémités carrées, d'une longueur de 0.9 à 10.0µm. Ces bactéries sont immobiles ou mobiles par des flagelles péritriches, aérobies ou anaérobies facultatives, mais certaines espèces peuvent être anaérobies strictes. Elles sont capables de former des endospores résistantes à différentes conditions telles que la température, les radiations, les désinfections et la dessiccation... (De Vos et al., 2009).

Ces bactéries se présentent isolées, en paires ou en chaînettes. Elles sont catalase positive, capable de croître sur des milieux ordinaires comme exemple la gélose nutritive. La morphologie de leurs colonies est très variable entre et au sein des espèces. La composition du milieu de culture et les conditions d'incubations influent sur cette morphologie. Mais, malgré cette diversité, les colonies du genre *Bacillus* ne sont pas difficile à identifier (De Vos et al. ; 2009) .

Les espèces du genre de *Bacillus* possèdent une diversité physiologique et métabolique importante et des capacités étonnantes qui leur permettent de survivre dans des habitats extrêmes, elles peuvent être thermophiles, psychrophiles, acidophiles, alcalophiles, halotolérants ou halophiles (Awais et al ., 2007). Elles sont chimio-organotrophes ou chimio-lithotrophes, certaines espèces sont prototrophes et d'autre auxotrophes exigent des facteurs de croissance (De Vos et al.,2009).

## 7.3. Ecologie du genre *Bacillus* :

Le genre *Bacillus* est parmi les microorganismes les plus abondantes et omniprésentes dans la nature (Bron et al ., 1999), son principale habitat est le sol surtout pour les espèces saprophytes ou elles jouent un rôle important dans les cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote, le matériel végétale et les exsudats racinaires représentent des sources importantes de nutriments organiques. Cependant ce genre peut être également isolé à partir des aliments, de l'eau, des organismes eucaryotiques (Dahl, 1999) et même à partir des environnements extrêmes comme les déserts, l'antarctique et les habitats hypersalins, dont la caractéristique la plus importante de ce genre et qui lui permet d'héberger plusieurs niches écologiques est la capacité de former des endospores (priest, 1993).

#### **7.4. Potentiels biotechnologiques de bactéries appartenant au genre *Bacillus* :**

Grace à son omniprésence dans la nature ainsi que sa diversité métabolique et génétique, il est en tête, de la production de différents enzymes, substances antimicrobiennes et des insecticides (**Bron et al ., 1999**), le genre *Bacillus* est devenue très exploité dans plusieurs applications biotechnologiques (**Priest., 1993**) , dont certaines de leurs substances ont une valeur dans le secteur pharmaceutique et d'autres sont testés in vitro pour contrôler les populations microbiennes des aliments(**Stein,2005**).

#### **7.5. 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 décrites 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**).aussi d'autre espèce qui peuvent croître entre 0 à 25%(p/v) NaCl comme la souche isolé du lac Goléa (**Klouche Khelil, 2013**) et qui a été affilié au genre *Bacillus*.

### **8. Taxonomie polyphasique et notion d'espèce**

La taxonomie est la science qui étudie les relations entre les organismes. Elle englobe l'identification, la classification et la nomenclature. Ces trois parties consistent à établir des taxons ou des groupes de procaryotes présentant des caractères communs, qui devront être identifiés et nommés sur la base de critères définis. La taxonomie des procaryotes moderne se base sur plusieurs techniques moléculaires, chacune puisant l'information à des niveaux cellulaires différents (protéines, acides gras, ADN...). Elle est de ce fait appelée taxonomie polyphasique. Les résultats obtenus de différents niveaux cellulaires permettent une classification «consensus» du microorganisme (**Zakhia et de Lajudie., 2006**).

Ces dernières années, ont vu la création de très nombreuses nouvelles espèces, de nouveaux genres et même de nouvelles familles, ordres voire classes. Par ailleurs, l'utilisation d'outils plus performants a mené à la reclassification d'espèces ou de genres déjà connus et de nombreux grands remaniements taxonomiques restent à venir. Cette classification des microorganismes est une discipline majeure permettant de rendre intelligible l'immense diversité de ces derniers, de développer des procédures systématiques pour leur identification et de mettre en place une nomenclature informative. L'identification, c'est à dire l'affiliation d'une bactérie à une espèce donnée, reste un des aspects les plus délicats c'est aussi un des aspects les plus importants, notamment en microbiologie clinique (Alauzet., 2009).

### **8.1. Taxonomie phénétique :**

Elle a recours aux méthodes phénotypiques reposant sur la détermination de caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des procaryotes via des techniques standardisées. Les tests sont basés soit sur les critères classiques ou traditionnels utilisés dans les schémas d'identification pratiqués dans la plupart des laboratoires de microbiologie, soit sur des tests spécialisés réservés à certains laboratoires (Denis et al., 2007).

### **8.2. Taxonomie numérique :**

En 1957, Sneath a développé une taxonomie qualifiée de numérique pour les bactéries. La méthode consiste à étudier, pour chaque souche, plus d'une centaine de caractères morphologiques, biochimiques, culturels, structuraux, etc. Elle attribue le même poids à chacun des caractères qui sont codés 1 (positif ou présence du caractère) ou 0 (négatif ou absence du caractère). Le but recherché est de rassembler dans une classe de similitude les individus les plus semblables. Les degrés de similitude entre individus sont finalement représentés sous la forme de dendrogrammes (Rosselló-Mora et Amann., 2001).

### **8.3. Taxonomie génotypique :**

Elle fait appel aux méthodes basées sur l'analyse des molécules d'ADN ou d'ARN, soit au niveau de l'ensemble du génome, soit en ciblant certains fragments du chromosome ou du plasmide bactérien. En effet, l'hybridation ADN-ADN, le pourcentage de G+C ou la cartographie chromosomique après électrophorèse en champ pulsé apportent des informations sur le génome des procaryotes dans sa globalité. On pourra également s'intéresser plus

particulièrement à certains gènes qui reflèteront l'évolution bactérienne dans une approche phylogénétique et pourront être ultérieurement utilisés en tant qu'outils d'identification (Alauzet., 2009).

Plusieurs génomes dans le monde halophile ont été séquencés à titre d'exemples celui d'*Halobacterium sp.* NRC-1 qui a été publié au 24 octobre 2000, dans un papier Coécrit par 44 scientifiques appartenant à un consortium international de 12 groupes et celui d'*Haloarcula marismortui* en 2004 (Ng et al., 2000; DasSarma et al., 2008).

# **Matériel et méthodes**

Ce présent travail a été réalisé durant la période de Février à Mai au niveau du laboratoire de microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'environnement (L.A.M.A.A.B.E), Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen.

### III-matériel et méthodes

#### 1. site étude et échantillonnage

##### 1.1 Site d'étude :

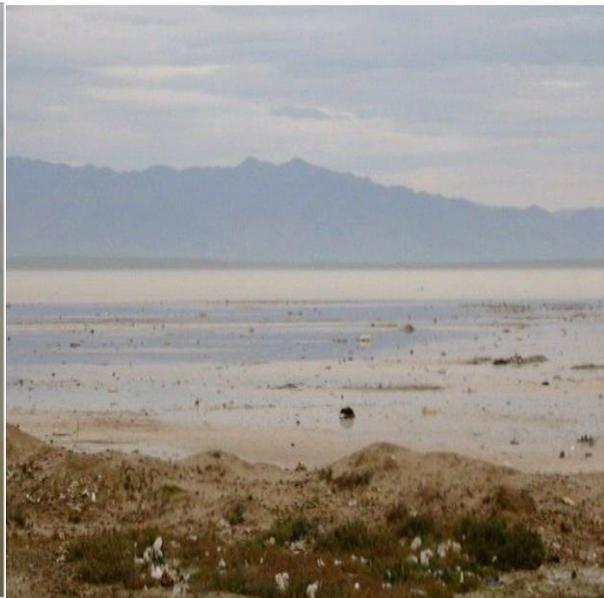
Les zones humides en Algérie occupent des superficies plus ou moins importantes. Concentré surtout à l'Est, ce complexe humide est surtout composé de lacs, de marais, de chotts, de sebkhas et de gueltas. Elles sont fortement productrices par la présence de tous les maillons de la chaîne alimentaire et hébergent entre autre une biodiversité aquatique remarquable (**Barkat, 2004**). Au cours de ce travail, la sebkha Oran a été choisie comme site étude.

La Sebkha d'Oran : est un lac sujet à la convention RAMSAR, située à 15km au sud d'Oran dans la commune de Misserghin et distante de 12 km de la mer Méditerranée (35° 32' 00" Nord. 0° 48' 00" Ouest) Elle est une dépression, fermée à 110 mètres d'altitude, limitée au Nord par le massif du Murdjajo et au Sud par le massif de Tessala. La sebkha occupe le fond de cette dépression, présentant une topographie apparemment plane, mais légèrement inclinée vers l'ouest, avec un point bas à 80 mètres d'altitude, et un point haut à 82 mètres de forme elliptique, sa longueur, d'orientation approximative sud-ouest/nord-est, est de 40 km, et sa largeur de 6 à 13 km.

Elle est alimentée par un réseau hydrographique qui afflue principalement des massifs du Tessala et du Murdjajo. Cependant l'eau de cette zone est salée. Le lac, qui forme une pellicule d'eau de 10 à 30 cm variant suivant la pluviométrie, s'assèche complètement durant l'été suite à une très forte évaporation et à la sécheresse qui frappe la région. Le climat est de type méditerranéen semi-aride, les précipitations varient entre 378 et 473 mm par an.



Figure N°8 : photo de la localisation de la Sebkha D'Oran (source : Google earth).



**Figure N°9** : Photos de la sebkha d'Oran prises en mois de février Photos prises avec un appareil photo numérique : Canon Ixus 310 HS

## 1.2. Echantillonnage :

Les prélèvements ont été réalisés durant le mois de février 2014 à partir de 4 sites proches de la commune de mesreghine.

Les échantillons d'eau sont collectés à partir des bords de 4 sites différents à une profondeur de 10 à 15 cm, dans des flacons en verre stérile 250ml, a raison de 4 flacons pour chaque site.

Les échantillons sont ensuite transportés au laboratoire dans une glacière et conservé à 4C°.

## 1.3 Isolement :

Isolement a été effectué dans un délai qui ne dépasse pas les 24h après les prélèvements les échantillons sontensemencé sur gélose nutritive à 10% NaCl pour sélectionner les bactéries halophiles et halotolérantes selon le protocole de **(Beric et al., 2012)**.

Donc puisque on s'intéresse au genre *Bacillus* et se basant sur les caractéristiques de la thermo résistance de leur spores, les échantillons ont subi un traitement thermique à 80°C Pendant 10min pour l'élimination de toute forme végétative.

Ensuite une série de dilutions décimales jusqu'à  $10^{-3}$  ont été réalisés dans un bouillon nutritif (BN) à 10% NaCl.

Enfin, les échantillons mère et les dilutions sontensemencés sur gélose nutritive à 10% NaCl et incubé à 30C° pendant 48 heures.

Les colonies à différents aspects macroscopique et microscopiques présentent les caractéristiques du genre *Bacillus* c'est-à-dire des bâtonnets à Gram positif capable de former des spores sont sélectionnées purifiés par repiquages successifs et conservés sur GN à 10% NaCl à 4C° pour faire objet d'une étude physiologique et biochimique.

## 2- Identification phénotypique des isolats :

Pour cette étude, 59 isolats ont été retenus et ont fait l'objet d'une identification morphologique et biochimique.

## **2-1 caractères microscopique et macroscopique**

Seules les souches qui présentent des caractères de bâtonnet à Gram positif et capable de former des spores ont été retenues

### **2.1.1 Aspect microscopique :**

#### **\*l'état frais :**

Un état a été réalisé sur des cultures jeunes des isolats sélectionnés pour observer la mobilité.

#### **\*coloration de Gram :**

La morphologie, l'arrangement des cellules les types pariétaux des isolats sont déterminés sur des cultures jeunes par la technique de la coloration de Gram après observation par microscope optique.

### **2-1-2 Aspect macroscopique :**

L'aspect macroscopique des colonies (forme, taille, couleur) est déterminé après incubation à 30°C sur gélose nutritive (GN) a 10% NaCl pendant 48h.

## **2-2 caractères physiologiques :**

La croissance de tous les isolats (bâtonnets, à Gram positive, capable de former des spores) a été étudiée pour les trois paramètres suivants (salinité, température, pH), l'état frais a été utilisé pour le suivi des croissances (croissance +, croissance -).

### **2.2.1 Croissance à différents températures**

L'évaluation de l'effet de la température sur la croissance des souches a été effectuée par incubation à différents température (**25, 30, 37, 42,55 °C**) des souchesensemencée sur gélose nutritive (GN) à 10% de NaCl à pH7 pendant 48 heures.

### **2 2-2 croissances à différents ph**

L'évaluation de la croissance des souches en fonctions du pH a été déterminée par la culture des souches sur gélose nutritive (GN) à 10% NaCl ajusté à des pH (**5, 6, 7, 8, 9**) l'incubation a été effectuée a 30C° pendant 48 heures.

### **2-2-3 tolérance a la salinité**

L'évaluation de la croissance des souches en fonction de la salinité a été déterminée par la culture des souches sur gélose nutritive (GN) à un pH 7, contenant des concentrations en NaCl de (1, 5, 7, 10, 15, 20%) après incubation à 30°C pendant 48 heures.

### **2-3 caractères biochimiques des isolats :**

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

#### **2-3-1 Mise en évidence des enzymes respiratoires**

##### **2-3-1-1 Catalase**

La présence de la catalase est mise en évidence en dissociant à l'aide de l'effilure d'une pipette Pasteur une quantité suffisante de la culture sur une lame de verre contenant une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes. La présence d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles d'oxygène (Gerhardt et al., 1994).

##### **2-3-1-2 Cytochrome-oxydase**

Il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase, dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui assure le transfert des électrons sur l'oxygène ou sur un autre oxydant minéral. Le principe consiste à déposer une colonie de la souche sur un disque imprégné du réactif oxalate de N-diméthyl paraphénylène-diamine de couleur rose. La présence de l'enzyme se traduit par un virage de la couleur rose vers un violet noirâtre (Health Protection Agency, 2011b).

##### **2-3-1-3 Nitrate réductase**

Ce test consiste à mettre en évidence la réduction des nitrates en nitrites par l'enzyme nitrate réductase. Il a été réalisé selon le protocole mentionné dans le Bergey's Manuel of Systematics [De Vos et al., 2009]. Les souches sont cultivées sur bouillon nitraté, après incubation à 30°C pendant 48 heures, trois gouttes de chacun des réactif NIT I (acide parasulfanilique 0,8 g en 5 N acide acétique) et NIT II (diméthyl- $\alpha$ -naphthylamine 0.6 ml ;

acide acétique 100 ml), appelés aussi réactifs de GRIESS, sont ajoutées à la culture. La réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge.

En absence de cette coloration, quelques milligrammes de la poudre de zinc sont additionnés s'il y a :

- Apparition de la coloration rouge : 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.

- Absence de coloration rouge : 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.

### **2-3-2 Croissance sur le milieu mannitol-mobilité**

La mobilité bactérienne et archéenne ainsi que la fermentation du mannitol sont étudiées en ensemencant le milieu semi-solide mannitol-mobilité par piqure centrale à l'aide d'un fil droit. La mobilité est révélée par un envahissement plus ou moins grand du milieu à partir de la piqure d'inoculation, l'utilisation du mannitol est traduite par un virage de la couleur du rouge au jaune (**Gerhardt et al., 1994**).

### **2-3-3 le type respiratoire :**

La mise en évidence du type respiratoire des souches est réalisée selon le protocole de **Guiraud (1998)**, sur une gélose profonde viande foie (VF) coulés dans des tubes. Au moment de l'emploi, la gélose est régénérée par chauffage au bain marie bouillant pendant 30 minutes, puis maintenue en surfusion à 45°C. L'ensemencement de la souche est effectué à l'aide d'une pipette pasteur qui est plongée au fond du tube, puis remontée en décrivant une spirale, de façon à ensemer uniformément le milieu. Après refroidissement et solidification du milieu, les cultures sont incubées à 30°C pendant 72 heures.

### **2-3-4 Le système api 20<sup>E</sup>**

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

Dans les microtubes, une suspension bactérienne des dix souches sélectionnées effectuée en API medium à partir d'une culture de 18 heures sur milieu gélose nutritive (GN) à 10% de NaCl (p/v) (équivalent à 0,5 McFarland) est ensemencée. Après incubation 24 heures à 30°C,

les réactions se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. L'interprétation des résultats se réfère au catalogue joint avec la plaque (voir annexe).

## **2-3-5 Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires**

### **2-3-5.1 Détermination de l'activité amylolytique**

La mise en évidence de l'hydrolyse de l'amidon est réalisée par l'ensemencement des souches en une seule strie sur gélose à amidon (annexe). Après incubation à 30°C des observations régulières sont effectuées chaque 24 heures pendant 72 heures, en recouvrant la gélose par une solution de lugol. L'absence de la coloration autour de la culture indique la dégradation de l'amidon alors que les zones contenant l'amidon se colorent en brun (**De Vos et al., 2009**).

### **2-3-5-2 Détermination de l'activité protéolytique**

#### **\*hydrolyse de la caséine :**

L'hydrolyse de la caséine est étudiée sur gélose au lait (annexe). Les souches sont ensemencées en une seule strie puis incubée à 30°C. Les résultats sont appréciés quotidiennement durant 72 heures. L'apparition d'une auréole claire autour de la culture indique la dégradation de la caséine (**De Vos et al., 2009**).

### **2-3-5-3 Détermination de l'activité lipolytique**

#### **\* hydrolyse du tween 80**

La dégradation du tween 80 par les souches est réalisée sur un milieu approprié (dont la composition est donnée en Annexe), elle se manifeste par l'apparition d'une auréole opaque autour de la culture après incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures (**Sierra, 1957**).

#### **\*Lécithinase**

Ce test est réalisé par ensemencement de la souche en une seule strie sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile (egg-yolk agar ou Gélose à l'œuf)(annexe). L'apparition de toute zone claire autour de la culture après 24 à 72 heures d'incubation à 30°C, témoigne que la souche possède la lécithinase (**De Vos et al., 2009**).

## **Résultats et discussion**

## IV- Résultats et discussion

### 1-Isolements et purifications des isolats :

Après avoir subi un traitement thermique à 80 °C pendant 10 min, les échantillons mère et les dilutions décimales ont été ensemencés sur une gélose nutritive à 10%NaCl et incubées à 30C° pendant 48 heures. Des colonies à différents aspect macroscopique et macroscopique sont apparues et après une étape de purification 59 souches ont été retenues selon les critères de sélection fixés déjà auparavant c'est-à-dire des bâtonnets à Gram positif et capable de former des spores.

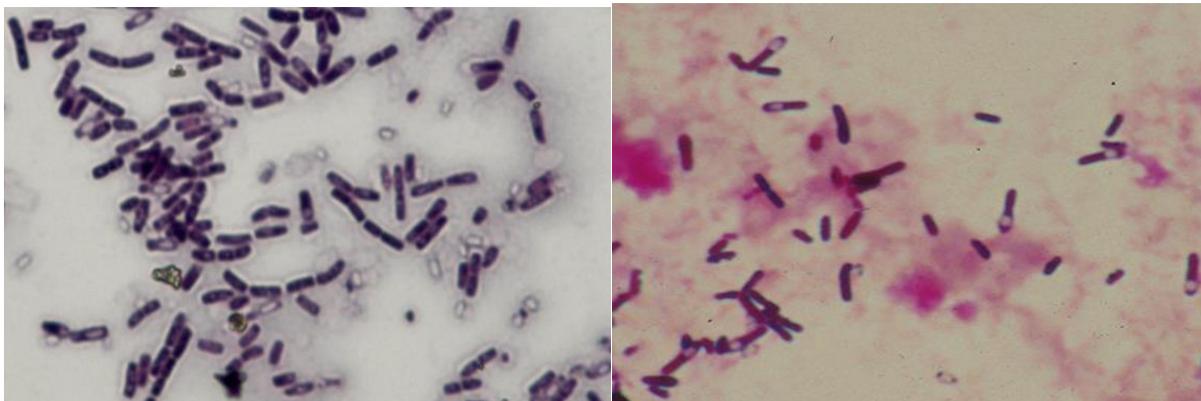
Ces derniers sont retenus pour cette étude et désignés selon un code composé de lettres et de numéros (de **LMB3014** jusqu'à **LMB3604**). La souche LMB3304 a été éliminée due à sa forme sphérique (coccus)

### 2- caractérisations phénotypiques des isolats :

#### 2-1 caractérisations morphologiques et culturelles :

##### 2-1-1 Aspect microscopique :

Le but de cette étude était porté sur le screening des bactéries halophiles précisément le genre *Bacillus* qui présente la forme bâtonnet à Gram positif sporulé, de ce fait seul ces derniers ont été retenus



**Figure N° 10** : Résultats d'observations microscopiques après la coloration de Gram (observation par microscope optique G×100 a immersion)

L'état frais a montré que les bactéries ont une diversité par rapport à la mobilité.

## 2-1-2 Aspect macroscopique :

Les résultats de l'examen macroscopique des souches sélectionnées à partir de la Sebkhia D'Oran sont mentionnés dans le tableau N° 5

**Tableau N° 5** : Résultats de l'aspect macroscopique des souches

Aspect des colonies								
souches	Taille	Forme	relief	contour	surface	opacité	couleur	Consistance
LMB3014	Moyenne (5mm)	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	opaque	Kaki foncé	muqueuse
LMB3024	Grosse (7mm)	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	opaque	Brun kaki	crémeuse
LMB3034	Grosse (8/6mm)	ovoïde	Œuf sur plat	régulier	Lisse brillante	opaque	Brun kaki	muqueuse
LMB3044	Moyenne (4mm)	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	Opaque (avec un point au centre)	Jaune Navarro	muqueuse
LMB3054	Petite (3mm)	étoile	Plate	Irrégulier	Lisse brillante	opaque	Jaune blé	crémeuse
LMB3064	Petite (3mm)	Ronde	Œuf à plat	Régulier	Lisse brillante	Opaque	Jaune doré	muqueuse
<b>LMB3074</b>	<b>Petite (2mm)</b>	<b>ronde</b>	<b>bombée</b>	<b>régulier</b>	<b>Lisse brillante</b>	<b>opaque</b>	<b>Brun roux</b>	<b>muqueuse</b>
LMB3084	Moyenne (3mm)	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	translucide	Brun kaki	muqueuse
LMB3094	Petite (2mm)	ronde	plate	régulier	Lisse brillante	opaque	Beige citron soie	muqueuse
LMB3104	Petite (3mm)	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	opaque	Brun roux	muqueuse
LMB3114	Petite (2mm)	ronde	plate	régulier	Lisse brillante	transparente	Blanc ivoire	muqueuse
LMB3124	Petite (3/2mm)	ovoïde	bombée	irrégulier	Lisse brillante	translucide	crème	muqueuse
LMB3134	Moyenne (4mm)	Bords dentel é	bombée	irrégulier	Lisse brillante	opaque	Jaune blé	muqueuse
LMB3144	Petites (2mm)	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	opaque	Jaune blé	muqueuse
LMB3154	Petites (2mm)	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	opaque	Jaune blé	muqueuse
<b>LMB3164</b>	<b>Petites (2/1mm)</b>	<b>ovoïde</b>	<b>plate</b>	<b>régulier</b>	<b>Lisse brillante</b>	<b>translucide</b>	<b>Brun bois</b>	<b>muqueuse</b>
LMB3174	Petites (3/2mm)	ovoïde	plate	régulier	Lisse brillante	translucide	Brun bois	muqueuse
LMB3184	Moyenne (5/3mm)	ovoïde	plate	régulier	Lisse brillante	opaque	Brun bois	muqueuse
LMB3194	ponctiforme	ronde	bombée	régulier	lisse	opaque	Jaune - orange	muqueuse
LMB3204	Petite (2mm)	ronde	plate	régulier	Lisse brillante	opaque	Blanc	muqueuse
LMB3214	Petites (2/1mm)	ovoïde	plate	régulier	Lisse brillante	translucide	Brun bois	muqueuse
LMB3224	Moyenne (5/3mm)	ovoïde	plate	irrégulier	Lisse brillante	opaque	Brun bois	muqueuse
LMB3234	Petites (2mm)	ronde	bombée	irrégulier	Lisse brillante	translucide	blanc	muqueuse

LMB3244	Moyenne (4mm)	ronde	bombée	régulier	lisse	translucide	orange	crémeuse
LMB3254	Petite (2mm)	ronde	bombée	régulier	lisse	opaque	orange	muqueuse

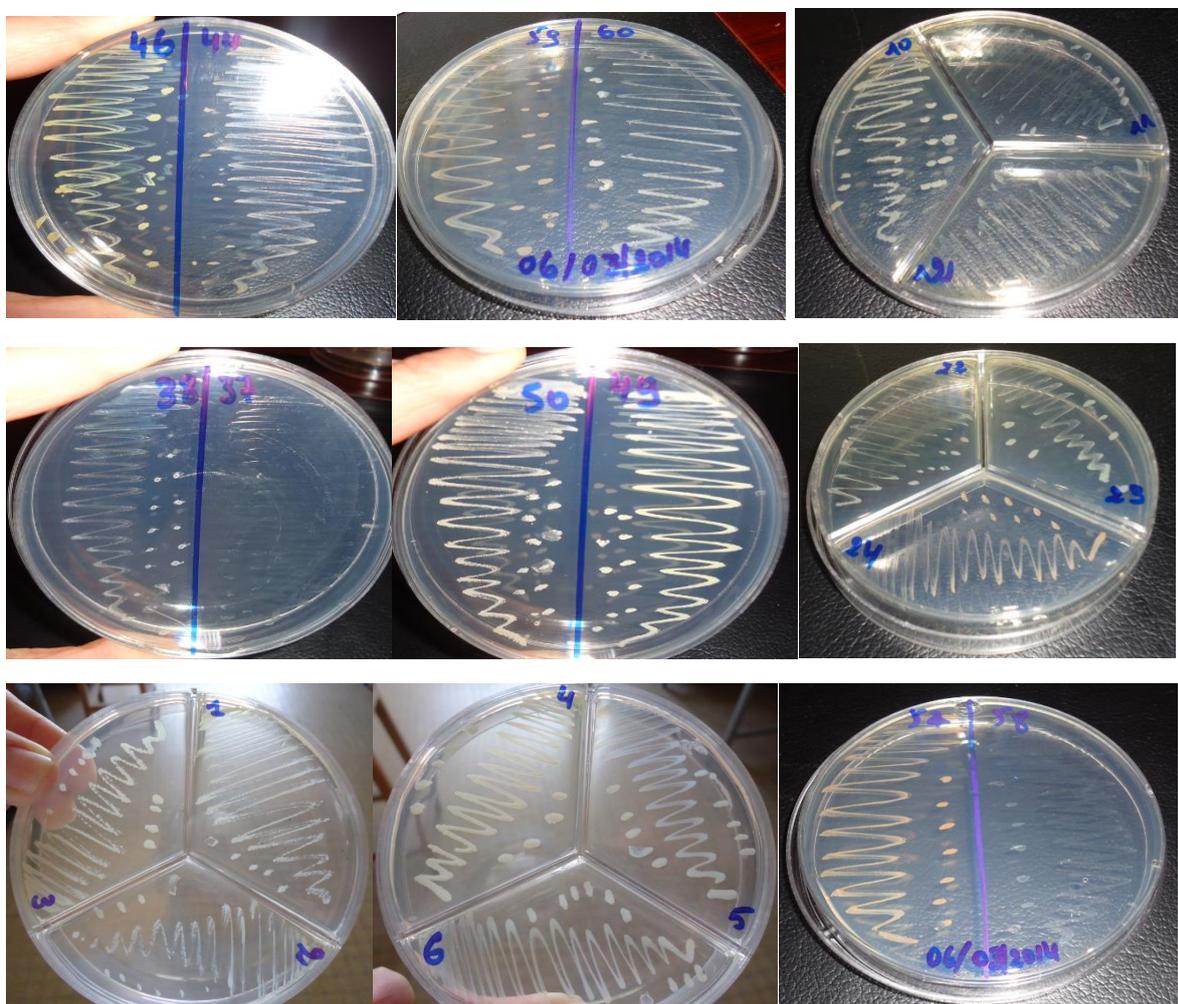
**Tableau N° 5 : Résultats de l'aspect macroscopique des souches (suite).**

LMB3264	Petite (3mm)	ovoïde	Plate	irrégulier	Lisse brillante	opaque	Jaune doré	muqueuse
LMB3274	Grosse (6mm)	ovoïde	Plate	régulier	Lisse brillante	opaque	Jaune Navarro	muqueuse
LMB3284	Moyenne (4/2mm)	ovoïde	bombée	régulier	Lisse brillante	translucide	Brun bois	muqueuse
LMB3294	ponctiforme	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	Transparente	blanche	muqueuse
LMB3314	Petite (2mm)	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	translucide	Brun bois	muqueuse
LMB3324	Moyenne (4mm)	ronde	bombée	irrégulier	Lisse brillante	opaque	blanche	crémeuse
LMB3334	Grosse (6mm)	Envah issante	Bord surélevé	régulier	lisse	opaque	blanche	Sèche
LMB3344	Grosse (7mm)	Envah issante	Bord surélevé	régulier	lisse	opaque	beige	Sèche
LMB3354	Grosse (6/4mm)	ovoïde	Plate	régulier	Lisse	transparente	blanche	sèche
LMB3364	ponctiforme	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	translucide	Blanche	muqueuse
LMB3374	ponctiforme	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	transparente	Blanche	muqueuse
LMB3384	Grosse (6mm)	ronde	Plate	régulier	Rugueuse	opaque	Beige citron soie	Sèche
LMB3394	Grosse (7/5mm)	ovoïde	Plate	bords dentelés	rugueuse	opaque	Beige citron soie	sèche
LMB3404	Grosse (8mm)	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	opaque	Jaune doré	muqueuse
LMB3414	Petite (2mm)	étoile	Plate	irrégulier	Lisse brillante	opaque	orange	muqueuse
LMB3424	ponctiforme	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	opaque	Jaune blé	muqueuse
LMB3434	Moyenne (5/2mm)	ovoïde	Plate	irrégulier	Lisse brillante	opaque	blanche	Muqueuse
LMB3444	ponctiforme	ronde	Bord surélevé	régulier	Lisse brillante	translucide	orange	muqueuse
LMB3454	Moyenne (5/2mm)	ovoïde	Plate	irrégulier	Lisse brillante	opaque	Jaune blé	muqueuse
LMB3464	Petite (2mm)	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	translucide	Jaune doré	muqueuse
LMB3474	ponctiforme	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	opaque	Jaune navarro	muqueuse
LMB3484	ponctiforme	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	opaque	blanche	muqueuse
LMB3494	Grosse (7mm)	Envah issante	Plate	irrégulier	Lisse brillante	opaque	Jaune	muqueuse
LMB3504	Petite (2mm)	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	opaque	Jaune blé	muqueuse
LMB3514	Moyenne (4mm)	ronde	Plate	régulier	lisse	opaque	orange	Sèche
LMB3524	Petite (3mm)	étoile	Plate	irrégulier	Lisse brillante	opaque	jaune	muqueuse
LMB3534	Petite (2mm)	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	transparente	Blanche	muqueuse
LMB3544	Moyenne (4/2mm)	ovoïde	Plate	Irrégulier	Lisse brillante	opaque	blanche	muqueuse
LMB3554	Moyenne (4/2mm)	ovoïde	Plate	bords dentelés	Lisse brillante	translucide	jaune	Crémeuse

**Tableau N° 5 : Résultats de l'aspect macroscopique des souches (suite).**

LMB3564	Moyenne (4/2mm)	ovoïde	Plate	régulier	Lisse brillante	opaque	Brun bois	muqueuse
LMB3574	ponctiforme	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	Opaque	orange	muqueuse
LMB3584	ponctiforme	ronde	bombée	régulier	Lisse brillante	translucide	Beige	muqueuse
LMB3594	Petite (2mm)	ronde	Plate	bords dentelés	Lisse brillante	translucide	Orange	muqueuse
LMB3604	Grosse (5mm)	ronde	Bombée	régulier	Lisse brillante	Opaque au centre	Beige	muqueuse

NB : les souches en couleur rouge sont les souches sélectionnées pour les plaques Api 20 E



**Figure N° 11 : Aspects macroscopiques des isolats sur gélose nutritive GN à 10% NaCl après 48heures d'incubation à 30°C Photos prises avec un appareil photo numérique : Canon Ixus 310 HS (zoom x2).**

## 2-2 Caractérisation physiologique des isolats :

Les résultats de la caractérisation physiologique des isolats sont rassemblés dans le tableau 6 aucune cinétique n'a été réalisée durant ce travail les résultats obtenues se traduisent par observation de la croissance positive ou négative sur l'état frais.

### 2 2-1 salinités :

La croissance sur milieu de culture dépourvu de sel est observée avec 35 souches et qui peuvent être qualifiées selon Kushner (1978) d'halotolérantes. Le reste des isolats, présentent des croissances variant entre 7% et 20% (p/v), qualifiés respectivement, d'halophiles modérés et extrêmes (Ventosa et al. 1998). (Tableau 6).

### 2.2.2. Température :

La gamme de température explorée varie de 25°C à 55°C. 19 isolats tolèrent des variations de températures de 25 à 55°C et la majorité des souches en une croissance à 30°C se sont des mésophiles. (Tableau 6).

### 2.2.3. pH :

L'intervalle de pH permettant la croissance de l'ensemble des souches se situe entre 5,0 et 9,0. Ce sont des acido-alcalinophiles.

**Tableau N° 6 :** Caractères physiologique (Salinité, température et pH) de croissance des souches

Souche	Salinité (%)	pH	Température C°
	Intervalle	Intervalle	Intervalle
LMB3014	0.0-20	5.0-9.0	25-30
LMB3024	0.0-20	5.0-9.0	25-30
LMB3034	0.0-20	5.0-9.0	30-37
LMB3044	0.0-20	5.0-9.0	30-42
LMB3054	1.0-20	5.0-9.0	30-55
LMB3064	1.0-20	5.0-9.0	30-55
LMB3074	1.0-20	5.0-9.0	25-55
LMB3084	0.5-20	5.0-9.0	25-55
LMB3094	0.0-20	5.0-9.0	25-55
LMB3104	0.0-20	5.0-9.0	30-37
LMB3114	2.0-20	5.0-9.0	25-55
LMB3124	0.0-20	5.0-9.0	25-55
LMB3134	0.0-20	5.0-9.0	25-37
LMB3144	0.0-20	5.0-9.0	25-55
LMB3154	0.0-20	5.0-9.0	25-55
LMB3164	2.0-20	5.0-9.0	25-42
LMB3174	2.0-20	5.0-9.0	25-42
LMB3184	0.0-15	5.0-9.0	25-30
LMB3194	0.0-15	5.0-9.0	25-30
LMB3204	1.0-15	5.0-9.0	25-30
LMB3214	2.0-20	5.0-9.0	25-37
LMB3224	1.0-20	5.0-9.0	25-42

LMB3234	2.0-20	5.0-9.0	25-42
LMB3244	0.0-20	5.0-9.0	25-55
LMB3254	0.5-20	5.0-9.0	25-55
LMB3264	0.0-20	5.0-9.0	25-42
LMB3274	0.0-20	5.0-9.0	25-55
LMB3284	2.0-20	5.0-9.0	25-55
LMB3294	1.0-15	5.0-9.0	30-30
LMB3314	1.0-20	5.0-9.0	25-37
LMB3324	0.0-20	5.0-9.0	25-55
LMB3334	0.0-15	5.0-9.0	25-55
LMB3344	0.0-10	5.0-9.0	30-55
LMB3354	0.0-15	5.0-9.0	30-55
LMB3364	1.0-15	5.0-9.0	30-37
LMB3374	1.0-15	5.0-9.0	30-30

LMB3384	0.0-20	5.0-9.0	30-55
LMB3394	0.0-20	5.0-9.0	30-55
LMB3404	2.0-20	5.0-9.0	25-42
LMB3414	0.0-20	5.0-9.0	25-42
LMB3424	2.0-15	5.0-9.0	25-55
LMB3434	1.0-15	5.0-9.0	30-42
LMB3444	0.0-20	5.0-9.0	25-42
LMB3454	0.0-20	5.0-9.0	25-55
LMB3464	0.0-20	5.0-9.0	25-37
LMB3474	10-20	5.0-9.0	30-30
LMB3484	10-20	5.0-9.0	30-30
LMB3494	0.0-20	5.0-9.0	25-55
LMB3504	0.0-20	5.0-9.0	25-55
LMB3514	0.5-20	5.0-9.0	25-55
LMB3524	0.0-20	5.0-9.0	25-55
LMB3534	2.0-15	5.0-9.0	25-37
LMB3544	0.0-20	5.0-9.0	25-55
LMB3554	0.0-20	5.0-9.0	25-55
LMB3564	0.0-20	5.0-9.0	25-55
LMB3574	0.0-20	5.0-9.0	25-42
LMB3584	0.0-15	5.0-9.0	30-30
LMB3594	0.0-20	5.0-9.0	25-42
LMB3604	0.0-20	5.0-9.0	25-55

### 3-cractéristiques biochimiques des isolats

#### 3-1 Mise en évidence des enzymes respiratoires et du type respiratoire :

Toutes les souches étudiées sont catalase et positives. Elles sont donc aérobies ou anaérobies facultatives. et plus que la moitié des souches sont cytochrome oxydase positives. et pour la nitrate réductase la majorité sont test positif à part quelque exception.

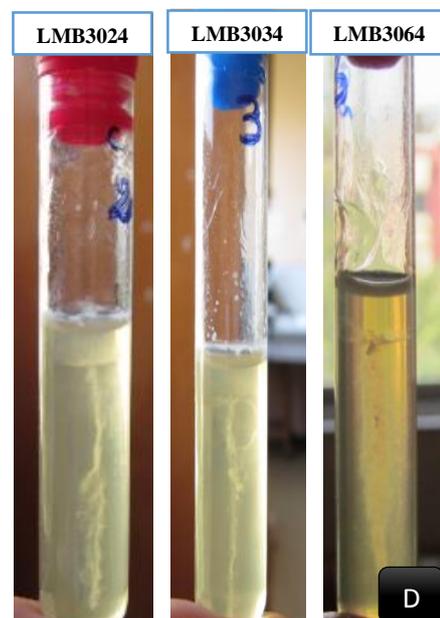
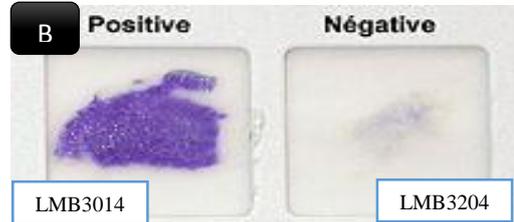
**Tableau N° 7 : Résultats de la recherche des enzymes respiratoires et du type respiratoire**

Souches	Catalase	Oxydase	Nitrate oxydase	Le type respiratoire
LMB3014	+	+	+	AF
LMB3024	+	+	+	AF
LMB3034	+	+	+	AF
LMB3044	+	+	+	AF
LMB3054	+	+	+	AF
LMB3064	+	+	+	AF
LMB3074	+	+	+	AF

**Tableau N° 7 : Résultats de la recherche des enzymes respiratoires et du type respiratoire (suite).**

LMB3084	+	+	+	AF
LMB3094	+	+	+	AF
LMB3104	+	+	+	AF
LMB3114	+	+	-	AF
LMB3124	+	+	+	AF
LMB3134	+	+	+	AF
LMB3144	+	+	+	AF
LMB3154	+	+	+	AF
LMB3164	+	+	-	AF
LMB3174	+	+	+	AF
LMB3184	+	+	+	AF
LMB3194	+	-	+	AF
LMB3204	+	-	+	AF
LMB3214	+	+	+	AF
LMB3224	+	+	+	AF
LMB3234	+	+	+	AF
LMB3244	+	-	-	AF
LMB3254	+	-	+	AF
LMB3264	+	+	+	AF
LMB3274	+	+	+	AF
LMB3284	+	+	+	AF
LMB3294	+	+	+	AF
LMB3314	+	+	+	AF
LMB3324	+	+	+	AF
LMB3334	+	+	+	AF
LMB3344	+	+	+	AF
LMB3354	+	+	+	AF
LMB3364	+	+	+	AF
LMB3374	+	-	+	AF
LMB3384	+	+	+	AF
LMB3394	+	+	+	AF
LMB3404	+	+	+	AF
LMB3414	+	-	+	AF
LMB3424	+	-	+	AF
LMB3434	+	-	+	AF
LMB3444	+	-	+	AF
LMB3454	+	+	+	AF
LMB3464	+	-	+	AF
LMB3474	+	-	+	AF
LMB3484	+	-	+	AF
LMB3494	+	-	+	AF
LMB3504	+	+	+	AF
LMB3514	+	-	+	AF
LMB3524	+	-	+	AF
LMB3534	+	+	+	AF
LMB3544	+	+	+	AF
LMB3554	+	-	+	AF
LMB3564	+	+	+	AF
LMB3574	+	-	+	AF
LMB3584	+	+	+	AF
LMB3594	+	-	+	AF
LMB3604	+	+	+	AF

\*AF : aéro-anaérobie facultatif + : résultat positif - : résultat négatif



**Figure N°12** : Résultats de la recherche des enzymes respiratoires et du type respiratoire

**A.** Résultat du test de la catalase (+)

**B.** Résultat du test de l'oxydase (LMB3014) test positive et (LMB3204) négative

**C** : Résultat du test de la recherche de la Nitrate réductase sur bouillon nitraté après 48 heures d'incubation à 30°C (souche(-) (LMB3114) et (+) (LMB3094) après l'ajout de réactifs NIT I et NIT II)

**D** : Résultat de la recherche du type respiratoire de quelques souches

### 3-2 Activités enzymatiques :

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

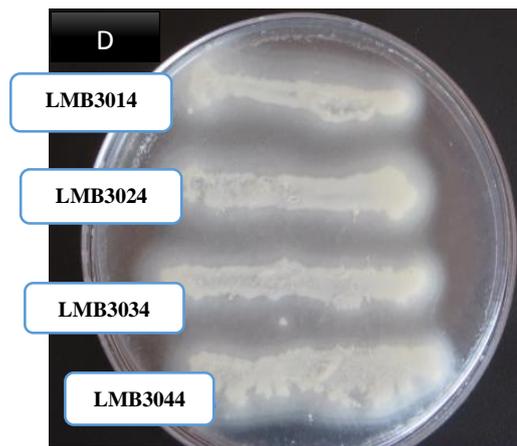
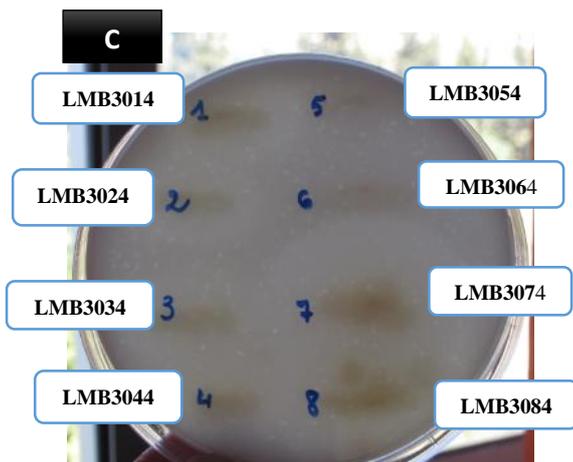
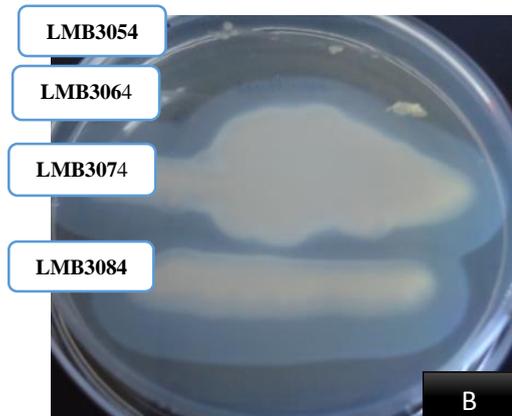
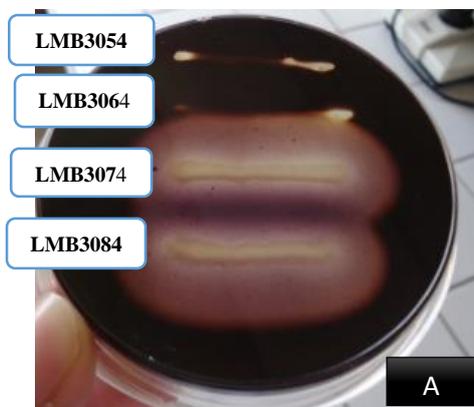
**Tableau N°8** : résultats de la mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires

Souches	Amylase	Lécithinase	Caséinase	Tween 80
LMB3014	+	+	+	+
LMB3024	+	+	+	+
LMB3034	+	-	+	+
LMB3044	+	+	+	+
LMB3054	-	-	-	+
LMB3064	-	-	-	+
LMB3074	+	+	+	+
LMB3084	+	+	+	+
LMB3094	-	+	+	-
LMB3104	+	+	+	+
LMB3114	-	+	+	-
LMB3124	-	+	+	-
LMB3134	+	-	-	-
LMB3144	+	-	-	-
LMB3154	+	-	-	-
LMB3164	+	-	+	+
LMB3174	-	-	+	-
LMB3184	+	-	+	-
LMB3194	+	-	+	+
LMB3204	+	+	+	-
LMB3214	+	-	+	+
LMB3224	+	+	-	+
LMB3234	+	+	-	+
LMB3244	-	-	+	+
LMB3254	-	-	+	-
LMB3264	-	-	-	+
LMB3274	+	+	-	+
LMB3284	+	-	+	+
LMB3294	-	+	-	+
LMB3314	-	-	+	-
LMB3324	-	+	-	+
LMB3334	+	+	-	-
LMB3344	+	+	-	-
LMB3354	+	+	-	+
LMB3364	-	+	+	+
LMB3374	-	-	-	-
LMB3384	+	+	-	-
LMB3394	+	+	-	+
LMB3404	-	+	-	+
LMB3414	+	-	+	+
LMB3424	-	+	+	+
LMB3434	-	+	-	+
LMB3444	+	-	+	+
LMB3454	+	+	+	+
LMB3464	+	+	-	-
LMB3474	-	-	-	-
LMB3484	-	-	-	-
LMB3494	+	+	+	+
LMB3504	+	-	+	+
LMB3514	-	-	+	-

**Tableau N°8** : résultats de la mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires (suite).

LMB3524	-	-	-	+
LMB3534	-	+	+	+
LMB3544	+	+	+	+
LMB3554	-	+	-	-
LMB3564	-	-	-	+
LMB3574	-	-	+	-
LMB3584	-	-	-	-
LMB3594	+	+	+	-
LMB3604	-	+	-	+

+ : résultat positif - : résultat négatif



**Figure N°13** : Activités enzymatiques

A-Dégradation de l'amidon

B-Dégradation de la lécithine

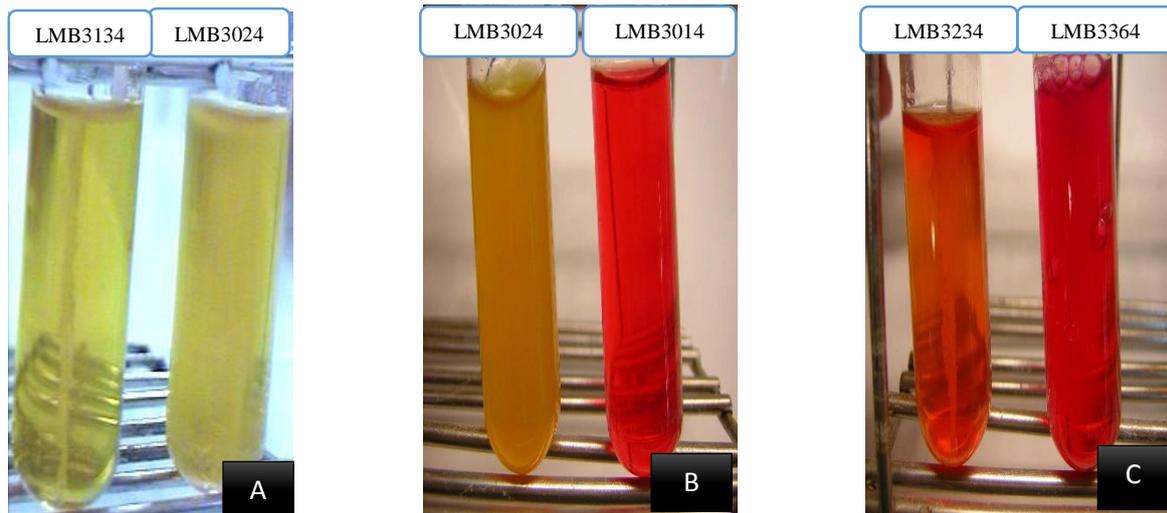
C-Dégradation de la caséine

D-Dégradation du Tween 80

### 3- 3 Test du mannitol mobilité :

**Tableau N°9 : Résultats du test mannitol mobilité**

<b>Souches</b>	<b>Mannitol</b>	<b>La Mobilité</b>
LMB3014	+	Mobile
LMB3024	-	Mobile
LMB3034	+	Mobile
LMB3044	+	Mobile
LMB3054	-	Mobile
LMB3064	-	Mobile
LMB3074	+	Immobil
LMB3084	+	Mobile
LMB3094	+	Mobile
LMB3104	-	Immobil
LMB3114	-	Immobil
LMB3124	-	Immobil
LMB3134	-	Immobil
LMB3144	+	Mobile
LMB3154	-	Mobile
LMB3164	-	Mobile
LMB3174	-	Immobil
LMB3184	-	Immobil
LMB3194	-	Mobile
LMB3204	-	Immobil
LMB3214	+	Immobil
LMB3224	-	Mobile
LMB3234	+	Immobil
LMB3244	-	Immobil
LMB3254	-	immobil
LMB3264	-	Mobile
LMB3274	-	Mobile
LMB3284	+	Immobil
LMB3294	-	Immobil
LMB3314	-	Immobil
LMB3324	-	Mobile
LMB3334	-	immobil
LMB3344	+	Immobil
LMB3354	-	Immobil
LMB3364	+	Mobile
LMB3374	-	Immobil
LMB3384	-	Immobil
LMB3394	-	Immobil
LMB3404	-	Mobile
LMB3414	-	Immobil
LMB3424	+	Immobil
LMB3434	+	Immobil
LMB3444	-	Mobile
LMB3454	-	Immobil
LMB3464	-	Immobil
LMB3474	-	Immobil
LMB3484	-	Immobil
LMB3494	+	Mobile
LMB3504	-	Mobile
LMB3514	-	Mobile
LMB3524	-	Mobile
LMB3534	+	Mobile
LMB3544	+	Mobile
LMB3554	-	Mobile
LMB3564	-	Immobil
LMB3574	-	Mobile
LMB3584	-	Immobil
LMB3594	-	Mobile
LMB3604	-	Immobil



**Figure N° 14 : résultats du mannitol mobilité**

**A**-souche immobile mannitol négative(LMB3134) et souche mobile mannitol négative(LMB3024)

**B**-souche mobile mannitol négative (LMB3024) et souche mobile mannitol positive (LMB3014)

**C**-souche immobile mannitol positive(LMB3234) et souche mobile mannitol positive (LMB3364)

### 3-4 Résultats des plaques API20E :

Le reste des tests biochimiques ont été réalisés sur plaques API 20 E, 10 souches ont été sélectionnées (LMB3074, LMB3164, LMB3274, LMB3324, LMB3334, LMB3344, LMB3354, LMB3384, LMB3394, LMB3494), en se basant sur leur réponses aux différents tests physiologiques et biochimiques d'une part et d'autre part le manque de moyens dans le laboratoire. Les tests ont été réalisés sur les Api20E juste pour apprécier les 20 tests présents sur cette plaque puisque normalement l'identification biochimique des bactéries du genre *Bacillus* se fait sur les plaques API 50CHB.

**Tableau N° 10** : Résultats des plaques API20E, des dix souches sélectionnées

souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
LMB3074	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
LMB3164	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+
LMB3274	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
LMB3324	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
LMB3334	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
LMB3344	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LMB3354	+	+	-	-		-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LMB3384	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
LMB3394	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
LMB3494	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

LMB3494



LMB3384



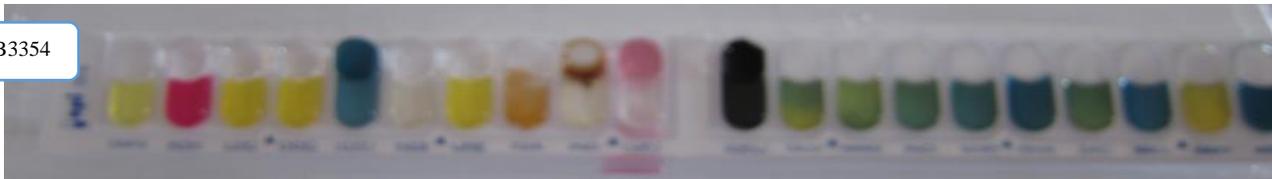
LMB3274



LMB3344



LMB3354



LMB3394



LMB3334



Figure N° 15 : résultats des plaques API20E de quelques souches

#### 4- Discussion :

La stratégie abordée par ce travail repose sur le screening des bactéries halophiles appartenant au genre *Bacillus* à partir d'échantillons d'eau de la Sebkha d'Oran.

Les échantillons ont été prélevés durant le mois de février 2014 à partir de 4 bords différents de la Sebkha les mesures de température et de pH sont réalisés *in situ*.

Le screening a été réalisé sur gélose nutritive à 10% NaCl sur la base de critères morphologiques et microscopique c'est-à-dire bâtonnets Gram positif capable de former des spores (**Beric et al., 2012**) à l'instar de ces critères, 59 souches sont retenues et ont fait objet :

- D'une étude des caractéristiques morphologiques
- D'une étude des caractéristiques culturelles
- Et enfin une étude des caractéristiques biochimiques

59 souches ont été isolées tout en se basant sur les critères cités auparavant, sur gélose nutritive à 10% NaCl à 30°C pendant 48 heures, il s'agit de bâtonnets aéro-anaérobie facultatif mobiles, et non-mobiles, à Gram positif, capables de former des spores. C'est le cas de la plupart des isolats bactériens aérobies ou aéro-anaérobies facultatifs et halotolérants isolés à partir de différents habitats salins tels que les lacs salés, les aliments salés et les estuaires d'eau (**Ventosa et al., 1989 ; Arahall et al., 1999 ; Yoon et al., 2004**) et qui ont été affiliés au genre *Bacillus*. Comme exemples l'espèce *Bacillus bagoriensis* isolée à partir d'un lac de soude au Kenya [**Vargas et al., 2005**], l'espèce *Bacillus okhensis* isolée à partir d'un lac salé en Inde [**Nowlan et al., 2006**], et l'espèce *Bacillus solisalis* isolée à partir d'un sol salé autour du lac salé de Yuncheng en Chine [**Liu et al., 2009**].

L'étude physiologique des souches sur milieu solide gélose nutritive (GN) à différentes conditions physico-chimiques (salinité, pH, et température) montre que 37 souches poussent à un intervalle de 0% à 20% NaCl ce qui nous permet de les considérer comme des souches extrêmement halotolérants selon **DasSarma (2001)**, qui explique que les souches qui tolèrent des concentrations en NaCl supérieur à 15% sont considérées comme des souches extrêmement halotolérants. Les résultats montrent aussi que 10 souches poussent à des concentrations de 2 à 15% NaCl et qui peuvent être considérées comme des halophiles modérés selon **Kushner (1978)**, parmi les souches isolées 2 souches LMB4474 et la LMB4484 poussent à un intervalle de 10 à 20% NaCl et qui peuvent être classés selon **Larsen (1962)** comme souches halophile stricts extrêmes ces dernières souches représentent les traits

typiques des espèces appartenant au genre *Bacillus* mais sur le point physiologique aucune revue bibliographique mentionne un *Bacillus* halophile strict qui pousse à 10 % ou plus NaCl ces derniers souches sont donc particulières, et leurs taxonomie doit être creusée.

L'intervalle de température explorée varie de 25 à 55°C. 23 isolats tolèrent des variations de températures de 25 à 55°C et 12 souches sont aussi capables de croître de 25 à 42°C (Tableau 6). Il s'agit donc de souches mésophiles à légèrement thermotolérantes à 55°C comme les souches LMB3074 et LMB3274 (**Mégraud, 2011**), 14 souches ont un intervalle de croissance entre 25 à 30°C il s'agit donc de souches mésophiles.

L'évaluation de la croissance des souches à différents pH (5 à 9) montre que toutes les souches tolèrent des pH alcalins, ce qui a été déjà montré par **Fritze (1996)** il confirme que les espèces du genre *Bacillus* capables de se développer à des concentrations salines allant jusqu'à 20% ou plus sont capables de pousser à des pH alcalins tels que *Bacillus pantothenicus* qui croit à un pH optimum de 9 à une concentration saline comprise entre 10% et 20%. Ces résultats sont en corrélation avec **Ventosa (1990)**, qui a isolé une espèce halophile du genre *Bacillus* à partir d'un lac salé au Japon *Bacillus halophilus* qui tolère des concentrations salines supérieures à 30% et qui pousse à des pH de 6 à 8 avec un optimum de 7.

Les souches isolées montrent aussi une tolérance à des pH acides, ce qui est en accord avec les résultats d'autres études, dont il a été montré que les microorganismes halophiles ou halotolérants peuvent se développer à des pH acides grâce à des mécanismes d'acidotolérance comme exemple l'accumulation de solutés compatibles et de protons H<sup>+</sup> [**Lewinson et al., 2004**]. Ce qui peut expliquer probablement la tolérance des souches isolées à un pH acide égal à 5.

44 souches possèdent une cytochrome oxydase et 59 souches possèdent une catalase. Généralement, c'est le cas de la majorité des microorganismes halophiles aérobies et membres des familles *Bacillaceae*, *Halomonadaceae* et *Halobacteriaceae* (**Oren, 2002a ; Arahal et al., 2007 ; De la Haba et al., 2011**).

L'étude enzymatique a montré que le bagage enzymatique des souches est très important, elles sont capables d'hydrolyser la caséine, l'amidon, la lécithine et le tween 80, elles possèdent aussi la catalase et l'oxydase et la nitrate réductase.

Parmi les isolats, 33 sont producteurs d'enzymes hydrolytiques extracellulaires. Ils sont dotés, principalement, d'une activité amylolytique. Elle est souvent rencontrée chez les isolats

halophiles modérés. Des résultats similaires sont obtenus par de nombreux auteurs. Par ailleurs, des études taxonomiques les ont classés à l'intérieur des genres *Virgibacillus*, *Thalassobacillus*, *Gracibacillus* et *Chromohalobacter* (Aguilera et al., 2007; Chen et al., 2008; Quesada et al., 2007; Sánchez-Porro et al., 2009). L'activité amylolytique est rencontrée également chez de nombreuses halobactéries (Oren et al., 1999; Oren et al., 2002b) et dont l'enzyme responsable a été identifiée comme étant une amyloglucosidase (Oren., 1983).

Les nombreuses études de caractérisation des amylases d'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).

En plus de l'activité amylolytique, 28 souches possèdent une activité protéolytique avec une préférence plus notable pour la dégradation de la caséine et la gélatine. Des études portant sur les protéases d'halophiles extrêmes et modérés ont montré leur stabilité en présence de 3% à 25% (p/v) de NaCl, sur un intervalle de pH (5 à 10) et aux températures comprises entre 40 et 75°C (Ryu et al. 1994; Vidyasagar et al., 2006; 2009). Egalement, des cellulases halophiles dérivées de *Bacillus sp.* (Aygan et al., 2008) et de *Salinivibrio sp.* (Wang et al., 2009) ont été caractérisées. Elles sont thermostables et stables à pH alcalin et en présence de fortes concentrations salines, ce qui fait d'elles des candidats idéaux pour différentes applications industrielles.

28 souches possèdent aussi une activité lipolytique elles hydrolyse le Tween 80 et la lécithine, de nombreux travaux ont permis d'isoler des souches halophiles d'environnements hypersalins possédant ces activités. Elles appartiennent aux genres *Salicola*, *Halomonas*, *Thalassobacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Gracilibacillus* et *Salinicoccus*. Ces lipases sont actives en présence de fortes concentrations salines (Rohban et al., 2009).

Il est intéressant de signaler que parmi les souches sélectionnées, plus que 18 souches possèdent des activités hydrolytiques combinées comme la souche (LMB3014 et la LMB3544) par exemple, d'où leur importance biotechnologique. La présence de telle combinaison chez les halophiles a été rapportée par de nombreuses études réalisées sur des habitats hypersalins géographiquement séparés. Il faut noter également que les souches à Gram positifs possèdent plus d'activités hydrolytiques. Ces résultats sont en accords avec ceux de nombreux auteurs (Sánchez-Porro et al., 2002, 2003 ; Moreno et al., 2007 ; Rohban et al., 2009).

Dans le même contexte, plusieurs études consacrées au screening des enzymes extracellulaires par des bactéries halophiles et halotolérantes ont montré que ces microorganismes possèdent un pouvoir enzymatique important [Sanchez-Porro et al., 2003a].

Auparavant, il a été également signalé que les espèces du genre *Bacillus* soient connues par leur importante production de plusieurs types d'enzymes, et plusieurs processus industriels utilisent ces espèces pour la production d'enzymes commerciales [McConnell et al., 1986].

Pour les autres tests biochimiques, ils ont été réalisés en utilisant la galerie **API 20 E** juste pour apprécier les 20 tests présents sur cette plaque puisque normalement l'identification biochimique des bactéries du genre *Bacillus* se fait sur les plaques API 50CHB seul 10 souches ont été sélectionnées (LMB3064, LMB3174, LMB3274, LMB3324, LMB3334, LMB3344, LMB3354, LMB33814, LMB3394, LMB3494) (dû au manque de moyens). En se basant sur leur réponses aux différents tests physiologiques et biochimiques, ce système est largement utilisé dans les méthodes d'identification pour les membres du genre *Bacillus* des études réalisées ont montré que les meilleures reproductions des tests pourrait être réalisée avec des plaques **API** qu'avec les tests classiques surtout pour la taxonomie du genre *Bacillus* (De vos et al., 2009).

Malgré que les analyses phénotypiques soient importantes en taxonomie microbienne, et qu'elles soient généralement faciles à étudier et bien significatives vu que les critères phénotypiques dépendent de l'expression de gènes qui sont souvent génétiquement stables, il est difficile de déterminer l'identité des souches et de les rassembler dans le genre *Bacillus*, néanmoins les résultats obtenus sont prometteurs et prouvent qu'on est sur la bonne voie. De nombreuses études suggèrent que le genre *Bacillus* constitue un genre hétérogène, d'un point de vue phénotypique, que la plupart des autres genres bactériens [Claus et Berkeley, 1986] et que les espèces appartenant à ce genre sont en augmentation continue et sont difficiles à identifier par les méthodes traditionnelles fondées sur les caractéristiques phénotypiques [Woese, 1987].

# **Conclusion générale**

## **Conclusion générale :**

Les organismes vivant en milieux extrêmes et en particulier, les microorganismes présentent un répertoire de 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, dans des milieux supposés hostiles à la vie. Egalement, les propriétés singulières de leurs biomolécules à savoir les enzymes ont très vite attiré l'attention des biotechnologues.

L'objectif essentiel de ce travail était un screening de souche halophiles appartenant au genre *Bacillus* à partir d'échantillons d'eau de la Sebkha D'Oran, et aussi un screening de plusieurs activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires a été effectué sur les 59 souches isolées.

Après traitement thermique 59 souches ont été isolés et retenus pour cette étude, l'observation macroscopique et microscopique a révélé que les souches présentent des critères de sélection des *Bacillus* c'est-à-dire des bâtonnets à Gram positif capable de former des spores.

L'étude physiologique sur états frais nous a révélé qu'il s'agit de souches halophiles modérés a extrêmement halotolérantes, mésophiles a légèrement thermotolérantes et qui tolèrent des pH acide et alcalins.

Sur le plan de la production d'enzymes Il est intéressant de signaler que parmi les souches sélectionnées, plus que la moitié des souches possèdent des activités hydrolytiques combinées, d'où leur importance biotechnologique.

Cette contribution à l'étude phénotypique et la mise en évidence d'activités enzymatiques extracellulaires de souches microbiennes isolées d'environnement hypersalins algérien-t-elle que la Sebkha D'Oran a donné des résultats très encourageants qui devront être complétés par une analyse polyphasique plus approfondie en introduisant de la chimiotaxonomie couplée à l'approche moléculaire.

L'objectif de ce travail a été en grande partie atteint, bien que certains paramètres ou certaines techniques prévues à effectuer n'aient pas pu être réalisées en raison de non disponibilité de matériels et de moyens.

Nous comptons identifier complètement les 59 souches sélectionnées par études physiologiques complète (cinétique), et phylogénétiques, pour confirmer qu'elles appartiennent au genre *Bacillus*.

Nous comptons aussi dans l'avenir optimiser les paramètres de culture des souches afin d'améliorer leur production de biomolécules à potentiel biotechnologique important.

Une piste très intéressante à suivre serait la recherche de la production des souches de substances antimicrobiennes (antibiotiques) sur ce cadre de recherche une étude est en cours, et ce modeste travail de caractérisations phénotypiques constitue un début d'investigation.

En plus, vu l'importance des souches sur le plan de la production d'enzymes extracellulaires et qui ont peut-être un potentiel biotechnologique, la purification de ces enzymes constitue une autre excellente perspective.

Nous soulignons par ailleurs, que ce modeste travail constitue une première, tant sur le choix du site d'étude que sur le screening de souches de *Bacillus* à partir de la Sebkhah D'Oran.

# **Références bibliographiques**

**Abreu C., Jurgens G., De Marco P., Saano A., and Bordalo A. A. (2001).** *Crenarchaeota* and *Euryarchaeota* in temperate estuarine sediments. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 713-718.

**Aguilera M., Jiménez-Pranteda M.L., Kharroub K., González-Paredes A., Durban J.J., Russell N.J., Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sánchez M. (2009).** *Marinobacter lacticisalsi* sp. Nov., a moderately halophilic bacterium isolated from the saline-wetland wildfowl reserve Fuente de Piedra in southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:1691–1695. Alauzet C. (2009). Taxonomie des bactéries anaérobies : de la reclassification à la découverte de nouveaux pathogènes. Thèse de doctorat, Université Henri Poincare. P. 299.

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

**Alauzet C. (2009).** Taxonomie des bactéries anaérobies : de la reclassification à la découverte de nouveaux pathogènes. Thèse de doctorat, Université Henri Poincare. P. 299.

**Alva V.A., Peyton B.M. (2003).** Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile *Halomonas campisalis*: influence of pH and salinity. *Environ Sci Technol* 37: 4397– 4402.

**Amoozegar M.A., Malekzadeh F., Malik K.A. (2003).** Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *Microbiol Methods* 52: 353-359.

**Amoozegar M.A., Fatemi Z.A., Karbalaee-Heidari H.R., Razavi M.R. (2007).** Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiol Res* 162: 369-377.

**Amoozegar M.A., Schumann P., Hajighasemi M., Ashengroph M., Razavi M.R. (2008).** *Salinicoccus iranensis* sp. nov., a novel moderate halophile. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 178–183.

**Antón J., Rossello-Mora R., Rodriguez-Valera F., Amann R. (2000).** Extremely halophilic Bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl Environ Microbiol* 66 (7): 3052–3057.

**Antunes A., Rayney F.A., Wanner G., Taborda M., Pätzold J., Nobre M.F., da Costa M., Huber R. (2008).** A new lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a brinefilled deep of the Red Sea. *J Bacteriol* 190: 3580–3587.

**Arahal D. R., Vreeland R.H., Litchfield C.D., Mormile M.R., Tindall B.J., Oren A., Bejar V., Quesada E., Ventosa A. (2007).** Recommended minimal standards for describing new taxa of the family Halomonadaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 2436–2446.

**Arahal D. R., Marquez M. C., Volcani B. E., Schleifer K. H. and Ventosa A. (1999).** *Bacillus marismortui* sp. nov., a new moderately halophilic species from the Dead Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49 : 521–530.

**Auguet J. C. and Casamayor E. O. (2008).** A hotspot for cold crenarchaeota in the neuston of high mountain lakes. *Environmental Microbiology* 10: 1080-1086.

**Aygan A., Arikan B. (2008).** A new halo-alkaliphilic, thermostable endoglucanase from moderately halophilic *Bacillus* sp. C14 isolated from Van soda lake. *Int J Agric Biol* 10: 369-374.

- Aygan A., Arikan B., Korkmaz H., Dinçer S., Çolak Ö. (2008).** Highly thermostable and alkaline  $\alpha$ -amylase from a halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. *Braz J Microbiol* 39: 547-553.
- Awais M., Aamer A. S., Abdul H. and Fariha H. (2007).** Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *Bacillus* sp. *Pak. J. Bot.*, 39(4): 1303-1312
- Barkat S. (2004).** ATLAS [IV] des zones humides Algériennes d'importance internationale : 1-107.
- Bakhtiar S., Estiveira R.J., Hatti-Kaul R. (2005).** Substrate specificity of alkaline protease from alkaliphilic feather-degrading *Nesterenkonia* sp. AL20. *Enzyme Microb Technol* 37: 534-540.
- Ben-Amotz A., Avron M. (1989).** The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. In: Cresswell R.C., Rees T.A.V., Shah N (Eds.), *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*. Longman Sci Tech Press, Harlow, UK: 91–114.
- Beyer N., Driller H., Bünger J. (2000).** Ectoïne a innovative, multi-functional active substance for the cosmetic industry, *Seifen Öle Fette Wachse* J 126: 26–29.
- Beldman G., Searle-Van Leewen M.F., Rombouts F.M., Voorzangen F.G.J. (1985).** The cellulase of *Trichoderma viride*. Purification, characterisation and comparison of al detectable endoglucanases, exoglucanases and  $\alpha$ -glucosidases. *Eur J Biochem* 146: 301-308.
- Boutaiba S., Hacene H., Bidle K.A., Maupin-Furlow J.A. (2011).** Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. *J Arid Environ* 75: 909-916.
- Brechot V.R. (2007).** La vie dans les milieux extrêmes, conférence : 1-8.
- Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M. (2005).** *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn, vol 2 (The Proteobacteria). Springer, New York. P. 1136.
- Bron S., Meima R., Dijn J. M. V., Wipat A. and Harwood C. R. (1999).** Molecular biology and genetics of *Bacillus* spp. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2<sup>nd</sup> Edition. Eds. Demain A. L. and Davies J. E., *ASM Press*. Washington, D.e. 392-416.
- Burhan A., Unaldi N., Coral G., Colak O., Aygan A., Gülnaz O. (2003).** Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate ANT-6. *Process Biochem* 38: 1397-1403.
- Burns D.G., Janssen P.H., Itoh T., Kamekura M., Echigo A., Dyll-Smith M.L. (2010).** *Halonotius pteroides* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon recovered from a saltern crystallizer. *Int J Syst Evol Microbiol*: 1196-1199..
- Bullock C. (2000).** The Archaea a biochemical perspective *Biochem. Mol Biol Edu* 28: 186-19.
- Buenger J., Driller H. (2004).** Ectoïne: an effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacol Physiol* 17: 232–237.
- Cavicchioli R. 2002.** Extremophiles and the search for extraterrestrial life. *Astrobiology*, 2:281-292.

**Chaban B., Ng S. Y. M., and Jarrell K. F. (2006).** Archaeal habitats - from the extreme to the ordinary. *Canadian Journal of Microbiology*, 52: 73-116.

**Calvo C., Martínez-Checa F., Toledo F.L., Porcel J., Quesada E. (2002).** Characteristics of bioemulsifiers synthesized in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 347–351

**Chen Y-G, Cui X-L., Zhang Y-Q., Li W-J., Wang Y-X., Xu L-H, Peng Q., Wen M-L., Cho B.C. (2005).** Heterotrophic flagellates in hypersaline waters. In: Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitaš A. (eds) *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria and Eukarya*. Springer, Dordrecht. Pp. 543–549.

**Chen L., Wang G., Bu T., Zhang Y., Wang Y., Liu M., Lin X. 2010.** Phylogenetic analysis and screening of antimicrobial and cytotoxic activities of moderately halophilic bacteria isolated from the Weihai Solar Saltern (China). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26:879–888.

**Coronado M.J., Vargas C., Hofemeister J., Ventosa A., Nieto J.J. (2000).** Production and biochemical characterization of an  $\alpha$ -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiol Lett* 183: 67-71.

**Claus D. and Berkeley C. W. (1986).** The Genus *Bacillus*. In: Sneath PHA ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.,1105-1139.

**Carrasco I. J., Màrquez M. C., Xue Y., Ma Y., Cowan D. A., Jones B. E., Grant W. D. and Ventosa A. (2007) a.** *Bacillus chagannorensis* sp. nov., a moderate halophile from a soda lake in Inner Mongolia, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 2084–2088.

**Costenaro L. (2001).** Interactions faibles protéine–protéine en solution: La malate déshydrogénase halophile, Thèse préparée au Laboratoire de Biophysique Moléculaire Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (CEA–CNRS–UJF), Grenoble: 16.

**Costenaro L. (2001).** Interactions faibles protéine–protéine en solution : La malate déshydrogénase halophile, Thèse préparée au Laboratoire de Biophysique Moléculaire Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (CEA–CNRS–UJF), Grenoble : 16.

**Cui H.L., Gao X., Yang X., Xu X-W. (2011a).** *Halolamina pelagica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Halobacteriaceae. *Appl Microbiol Biotechnol* 61(7):1617-1621.

**Cui H-L., Gao X., Sun F-F., Dong Y., Xu X-W., Zhou Y-G., Liu H-C., Oren A., Zhou P.J. (2010a).** *Halogramum rubrum* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a marine solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1366-1371.

**Cui H-L., Gao X., Yang X., Xu X-W. (2010c).** *Halorussus rarus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Halobacteriaceae isolated from a marine solar saltern. *Extremophiles* 14 (6): 493-499.

**Cui H-L., Li X-Y., Gao X., Xu X-W., Zhou Y-G., Liu H-C., Oren A., Zhou P-J. (2010b).** *Halopelagius inordinatus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Halobacteriaceae isolated from a marine solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:2089-2093.

**Cui H-L., Yang X., Gao X., Xu X-W. (2011b).** *Halobellus clavatus* gen. nov., sp. nov. and *Halorientalis regularis* gen. nov., sp. nov., two new members of the family Halobacteriaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:2682-2689.

**Dahl M. K. (1999).** *Bacillus*. In: Encyclopedia of Food Microbiology. Eds. Robison E. K, Batt C. A. and Patel P. D. Volume 1. *Academic Press*. UK. 113-158.

**D'Alessandro C.P., De Castro R.E., Giménez M.I., Paggi R.A. (2006).** Effect of nutritional conditions on extracellular protease production by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. *Lett Appl Microbiol* 44: 637–642.

**D'Amico S, Collins T, Marx J-C et al. (2006)** psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Reports* 7: 385–389.

**DasSarma, S. (2001).** Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences* : 1-9

**Davis J.S., Giordano M. (1996).** Biological and physical events involved in the origin, effects, and control of organic matter in solar saltworks. *Int J Salt Lake Res* 4: 335–347.

**De la Haba R.R., Sánchez-Porro C., Marquez M. C., Ventosa A. (2011).** Taxonomy of halophiles, In: Horikoshi K. (ed.), *Extremophiles Handbook*, Springer. P. 1248.

**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*, 2<sup>nd</sup> ed., The *Firmicute*. Springer. New York. Volume 3. 63-67.

**Denger K., Warthmann R., Ludwig W., Schink B. (2002).** *Anaerophaga thermohalophila* gen. nov., sp. nov., a moderately thermohalophilic, strictly anaerobic fermentative bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:173–178.

**Desmarais D., Jablonski P.E., Fedarko N.S., Roberts M. F. (1997).** 2-Sulfotrehalose, a novel osmolyte in haloalkaliphilic Archaea. *J Bact* 179: 3146-3153.

**Dohrmann A.B., Müller V. (1999).** Chloride dependence of endospore germination in *Halobacillus halophilus*. *Arch Microbiol* 172: 264-267.

**Donachie S.P., Bowman J.P., Alam M. (2004).** *Psychroflexus tropicus* sp. nov., an obligately halophilic Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides group bacterium from an Hawaiian hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 935–940.

**Don T.M., Chen C.W., Chan T.H. (2006).** Preparation and characterization of poly (hydroxyalkanoate) from the fermentation of *Haloferax mediterranei*. *J Biomater Sci Polymer Edn* 17: 1425–1438.

**Denis F., Ploy M.C., Martin M., Bingen E., Quentin R. (2007).** *Bactériologie Médicale. Techniques usuelles*. Edn Elsevier Masson. P. 631.

**Díaz M.P., Grigson S.J.W., Peppiatt C.J., Burgess J.G. (2000).** Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. *Mar Biotechnol* 2: 522–532.

**Díaz M.P., Boyd K.G., Grigson S.J.W., Burgess J.G. (2002).** Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. *Biotechnol Bioeng* 79: 145–153.

**Echigo A., Hino M., Fukushima T., Mizuki T., Kamekura M. and Usami R. (2005).** Endospores of halophilic bacteria of the family *Bacillaceae* isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm) *Saline Systems*, 1:8.

**Eichler J. (2001).** Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnol Adv* 19: 261–278. *Environ* 58: 273-284.

**Emerson D., Chauhan S., Oriol P., Breznak J. A. (1994).** *Haloferax* sp. D1227, a halophilic Archaeon capable of growth on aromatic compounds. *Arch Microbiol* 161:445–452.

**Feuga A.M. (1997).** Microalgues marines : Les enjeux de la recherche. IFREMER. P. 15

**Franzmann P.D., Wehmeyer U., Stackebrandt E. (1988).** Halomonadaceae fam. nov., a new family of the class Proteobacteria to accommodate the genera Halomonas and Deleya. *Syst Appl Microbiol* 11:16–19.

**Fritze D. (1996).** *Bacillus haloalkaliphilus* sp. nov. *Internation Journal of Systematica Bacteriology*, 98 -101.

**Fairley D.J., Boyd D.R., Sharma N.D., Allen C.C., Morgan P., Larkin M.J. (2002).** Aerobic metabolism of 4-hydroxybenzoic acid in Archaea via an unusual pathway involving an intramolecular migration (NIH shift). *Appl Environ Microbiol* 68: 6246–6255.

**Fukushima T., Mizuki T., Echigo A., Inoue A., Usami R. (2005).** Organic solvent tolerance of halophilic  $\alpha$ -amylase from a haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1. *Extremophiles* 9: 85–89.

**Galinski E.A. (1995).** Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol* 37: 273– 328.

**García L. (2002).** La vie dans les milieux extrêmes. Texte de la 433 ème conférence de l'Université de tous les savoirs : 1.

**García M.T., Mellado E., Ostos J.C., Ventosa A. (2004).** *Halomonas organivorans* sp. nov., a novel moderate halophile able to degrade aromatic compounds. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1723–1728.

**García M.T., Gallego V., Ventosa A., Mellado E. (2005).** *Thalassobacillus devorans* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, phenol-degrading, Gram-positive bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1789–1795.

**Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T. (2005).** Phylum XIV Proteobacteria phyl nov. In: Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 2, 2<sup>nd</sup> edn, (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria). Springer, New York: 1.

**Garrity G.M., Holt J.G. (2001).** Taxonomic outline of the archaea and bacteria. In: Boone D.R., Castenholz R.W (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1, 2<sup>nd</sup> edn, The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria. Springer, New York: Pp. 155–166.

**Gauthier M.J., Lafay B., Christen R., Fernandez L., Acquaviva M., Bonin P., Bertrand J.C. (1992).** 107 gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 42: 568–576.

**Gerday C. and Glansdorff N. (2007).** Physiology and biochemistry of extremophiles. *ASM press, Washington, DC*. P. 450.

**Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W. A., Krieg N. R. (1994).** Methods for General and Ghassemi F., Jakeman A. J. and Nix H. A. 1995. Salinisation of Land and Water Resources. (Eds.). Wallingford Oxon: CAB International.

**Ghanem A. (2007).** Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* 63(8): 1721-1754.

**Govender L., Naidoo L., Setati M.E. (2009).** Isolation of hydrolase producing bacteria from Sua pan solar salterns and the production of endo-1, 4- $\beta$ -xylanase from a newly isolated haloalkaliphilic *Nesterenkonia* sp. *Afr J Biotechnol* 8: 5458-5466.

**Govender L., Naidoo L., Setati M.E. (2009).** Isolation of hydrolase producing bacteria from Sua pan solar salterns and the production of endo-1, 4- $\beta$ -xylanase from a newly isolated haloalkaliphilic *Nesterenkonia* sp. *Afr J Biotechnol* 8: 5458-5466.

**Goldman Y., Garti N., Sasson Y., Ginzburg B.Z., Bloch M.R. (1980).** Conversion of halophilic algae into extractable oils. *Fuel* 59: 181–184.

**Grant W.D. (2004).** Life at low water activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359: 1249–1267.

**Grant W.D., Kamekura M., McGenity T.J., Ventosa A. (1998).** Class III. Halobacteria class nov. In: Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1, 2<sup>nd</sup> edn, The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria. Springer, New York. Pp. 294–301.

**Greenberg E.P., Canale-Parola E. (1976).** *Spirochaeta halophila* sp. nov. a facultative anaerobe from a high-salinity pond. *Arch Microbiol* 110: 185–194.

**Gunde-Cimerman N., Frisvad J.C., Zalar P., Plemenitaš A. (2005).** Halotolerant and halophilic fungi. In: Deshmukh S.K., Rai M.K. (eds), *Biodiversity of Fungi—Their Role in Human Life*. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi. Pp. 69–128.

**Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog S., Plemenitaš A. (2000).** Hypersaline waters in salterns e natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol Ecol* 32: 235–240.

**Gupta R., Gigras P., Mohapatran H., Goswami K.V., Chauhan B. (2003).** Microbial  $\alpha$ -amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 38: 1599-1616.

**Gupta A., Roy I., Patel R.K., Singh S.P., Khare S.K., Gupta M.N. (2005).** One step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *J Chromatogr A* 1075: 103-108.

**Ginzburg B.Z. (1991).** Liquid fuel (oil) from halophilic algae: a renewable source of nonpolluting energy in: *General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms*, RodriguezValera F. edn, Plenum Press, New York: Pp. 389–395.

**Guo B., Chen X.L., Sun C.Y., Zhou B.C., Zhang Y.Z. (2009).** Gene cloning, expression and characterization of a new cold-active and salt-tolerant endo- $\beta$ -xylanase from marine *Glaciecola mesophila* KMM 241. *Appl Microbiol Biotechnol* 84: 1107–1115.

- Hacène H., Rafa F., Chebhouni N., Boutaiba S., Bhatnagar T., Baratti J. C., Ollivier B. Hachicha M. (2007)**, Les sols salés et leur mise en valeur en Tunisie. *Sécheresse* ; 18 (1) : 45-50. Halophiles, In: Horikoshi K. (ed.), *Extremophiles Handbook*, and Springer. P. 1248. halophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 35:55–58. halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Cabo de Gata, Almería, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1238–1242.
- Hartmann R., Sickinger H-D., Oesterhelt D. (1980)**. Anaerobic growth of halobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3821–3825.
- Health Protection Agency. (2011b)**, *Oxidase Test*. UK Standards for Microbiology Investigations. 26 Issue 2.2.
- Horikoshi K. 1971**. Production of alkaline enzymes by alkaliphilic microorganisms. I. Alkaline protease produced by *Bacillus* no. 221. *Agric. Biol. Chem.* 35:1407–1414.
- Horikoshi K. 1999**. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63: 735–750.
- Hasper A.A., Dekkers E., Mil M.V., Van de Vondervoort P.J.I., De Graaff L.H. (2002)**. Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl Environ Microbiol* 68(4): 1556-1560.
- Hiraga K., Nishikata Y., Namwong S., Tanasupawat S., Takada K., Oda K. (2005)**. Purification and characterization of serine proteinase from a halophilic bacterium, *Filobacillus* sp. RF2-5. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 38-44.
- Inoue K., Itoh T., Ohkuma M., Kogure K. (2010)**. *Halomarina oriensis* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a seawater aquarium. *Int J Syst Evol Microbiol* 61(4): 942-946.
- Irwin J. A., Baird A. W. (2004)**. Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Irish Veterinary Journal*. Volume 57 (6).
- Ivanova E.P., Mikhailov V.V. (2001)**. A new family, Alteromonadaceae fam. nov., including marine proteobacteria of the genera *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Idiomarina* and *Colwellia*. *Mikrobiologiya* 70:15–23.
- Jiang H., Dong H. Zhang G., Yu B., Chapman L. R. and Fields W. M. 2006**. Microbial diversity in water and sediment of lake chaka, an athalassohaline lake in Northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology*, 3832–3845.
- Kanapathipillai M., Lentzen G., Sierks M., Park C.B. (2005)**. Ectoïne and hydroxyectoïne inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid. *FEBS Lett* 579: 4775–4780.
- Kamekura M., Hamakawa T., Onishi H. (1982)**. Application of halophilic nuclease H of *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* to commercial production of flavoring agent 5'-GMP. *Appl Environ Microbiol* 44: 994–995.
- Kamekura M. (1986)**. Production and function of enzymes from eubacterial halophiles. *FEMS Microbiol Rev* 39: 145–150.
- Karbalaei-Heidari H.R., Amoozegar M.A., Ziaee A.A. (2009)**. Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium. *Ind Microbiol Biotechnol* 36: 21-27.

- Kargi F., Dinçer A.R., Pala A. (2000).** Characterization and biological treatment of pickling industry wastewater. *Bioprocess Engin* 23: 371–374.
- Kazan D., Denizci A. A., Oner M. N. K. and Erarslan A. (2005).** Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. *J. Indus. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 335-344.
- Kennedy S.P., Ng W.V., Salzberg S.L., Hood L., DasSarma S. (2001).** Understanding the adaptation of Halobacterium species NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence. *Genome Res* 11: 1641-1650.
- Kharroub K., Quesada T., Ferrer R., Fuentes S., Aguilera M., Boulahrouf A., Ramos Cormenzana A., Monteoliva-Sánchez M. (2006b).** Halorubrum ezzemoulense sp. nov., a halophilic archaeon isolated from Ezzemoul sabkha, Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1583–1588.
- Khelil Klouche N. (1998)** Etude des antibiotiques biosynthétisés par des bactéries filamenteuses extrêmophiles, notamment *Metallogenium* sp. Thèse de Magister en Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université Aboubakr Belkaid- Tlemcen, Institut des sciences de la Nature. Algérie. 157p.
- Kim K.K., Lee K.C., Oh H-M., Lee J-S. (2010).** Halomonas stevensii sp. nov., Halomonas hamiltonii sp. nov. and Halomonas johnsoniae sp. nov., isolated from a renal care centre. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:369–377.
- Kis-Papo T., Oren A., Wasser S.P., Nevo E. (2003).** Survival of filamentous fungi in hypersaline Dead Sea water. *Microb Ecol* 45:183-190.
- Kleinsteuber S., Riis V., Fetzer I., Harms H., Müller S. (2006).** Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments. *Appl Environ Microbiol* 72: 3531–3542.
- Kobayashi K., Kanai H., Aono R., Horikoshi K., Kudo T. (1994).** Cloning, expression, and nucleotide sequence of the  $\alpha$ -amylase gene from the haloalkaliphilic archaeon Natronococcus sp. strain Ah-36. *J Bacteriol* 176:5131–5134.
- Kristjansson J. K. and Hreggvidsson G. O. (1995).** Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 17-25.
- Kunte H., Trüper H., and Stan-Lotter H. (2002).** Halophilic Microorganisms in Astrobiology "*The Quest for the Conditions of Life*", Berlin, Springer.
- Kushner D. J. (1993).** Growth and nutrition of halophilic bacteria. In *The biology of halophilic bacteria*. Eds. R. H. Vreeland & L. I. Hochstein. pp. 87-103. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Kushner D.J. (1978).** Life in high salt and solute concentrations. In: Kushner D.J (ed) *Microbial Life in Extreme Environments*. Academic Press London. Pp. 317-368.
- Kulichevskaya I.S., Milekhina E.I., Borzenkov I.A., Zvyagintseva I.S., Belyaev S.S. (1992).** Oxidation of petroleum hydrocarbons by extremely halophilic Arch *Microbiol* 60: 596–601.

**Lanyi J.K. (1974).** Salt dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev* 38: 272-290.

**Lentzen G., Schwarz T. (2006).** Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 623–634.

**Lewinson O., Padan E. and Bibi E. (2004).** Alkalitolerance: A biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis. *P.N.A.S.*, 39: 14073 - 14078.

**Litchfield C.D., Gillevet P.M. (2002).** Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: A preliminary assessment. *J Ind Microbiol & Biotechnol* 28 (1): 48-55.

**Liu H., Zhou Y., Liu R., Zhang K. Y. and Lai R. (2009).** *Bacillus solisalsi* sp. nov., a halotolerant, alkaliphilic bacterium isolated from soil around a salt lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1460–1464.

**Logan N. A. and Berkeley R. C. W. (1984).** Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J. Gen. Microbiol.*, 130, 1871–1882.

**Lopetcharat K., Choi Y.J., Park J.W., Daeschel M.A. (2001).** Fish sauce products and manufacturing a review, *Food Rev Int* 17: 65–88.

**Ludwig W., Schleifer K.H., 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., Whitman W.B (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 3, 2<sup>nd</sup> edn, The firmicutes. Springer, New York. Pp. 1–13.

**Ludwig W., Klenk H.P. (2001).** Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In: Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M (edn) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1, 2<sup>nd</sup> edn. Springer, New York. Pp. 49–65.

**Lynd L. R., Weimer P. J., Van Zyl W.H., Pretorius I. S. (2002).** Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol and Molecul Biol Rev* 66 (3): 506-577.

**MacDonald I.R., Reilly II J.F., Guinasso N.L. Jr et al. (1990).** Chemosynthetic mussels at a brine-filled pockmark in the northern Gulf of Mexico. *Science* 248: 1096–1099.

**Madern D., Pfister C., Zaccai G. (1995).** Mutation at a single acidic amino acid enhances the halophilic behaviour of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* in physiological salts. *Eur J Biochem* 230: 1088-1095.

**Madigan M.T., Martinko J.M. (2006).** *Brock Biology of Microorganisms*, 11th edition. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. Pp. 1012.

**Margesin R. Schinner, F. (2001).** Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 563–650.

**Maughan H. and Van der Auwera G. (2011).** *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*. 11 ; 789–797.

**Makhdoumi-Kakhki A., Amoozegar M.A., Ventosa A. (2012).** *Salinibacter iranicus* sp. nov. and *Salinibacter luteus* sp. nov., isolated from a salt lake, and emended descriptions of the genus *Salinibacter* and *Salinibacter ruber*. *IJSEM*: 1-26 (sous presse).

**Mamo G., Thunnissen M., Hatti-Kaul R., Mattiasson B. (2009).** An alkaline active xylanase: Insights into mechanisms of high pH catalytic adaptation. *Biochimie* 91: 1187-1196.

**Mancinelli R.L., Hochstein L.I. (1986).** The occurrence of denitrification in extremely Microbiol Mol Biol Rev 62: 504–544

**Massana R., DeLong E. F., and Pedros-Alio C. 2000.** A few cosmopolitan phylotypes dominate planktonic archaeal assemblages in widely different oceanic provinces. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1777-1787.

**McGenity T.J., Gemmell R.T., Grant W.D., Stan-Lotter H. (2000).** Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environ Microbiol* 2: 243-250

**Mégraud F. (2011).** De l'agent infectieux à l'hôte-bactériologie : Physiologie bactérienne, pouvoir pathogène des bactéries. *Cours PCEM* 2: 1-6.

**Mellado E., Ventosa A. (2003).** Biotechnological potential of moderately and extremely Halophilic microorganisms In: *Microorganisms for Health Care, Food and Enzyme Production*. Research Signpost, Kerala: 233–256

**Mesbah N. M., Cook G. M. and Wiegel J. (2009.)** The halophilic alkalithermophile *Natranaerobius thermophilus* adapts to multiple environmental extremes using a large repertoire of Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporters. *Molecular Microbiology*, 74(2), 270-281.

Microbiol Mol Biol Rev 62: 504–544.

**Midgley D. J., Saleeba J. A., Stewart M. I. and McGee P. A. (2007).** Novel soillineages of Archaea are present in semi-arid soils of eastern Australia. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 129-138.

**Mijts B.N., Patel B.K.C. (2002).** Cloning, sequencing and expression of an  $\alpha$ -amylase gene, amyA, from the thermophilic halophile *Halothermothrix orenii* and purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiol* 148: 2343-2349.

**Minegishi H., Echigo A., Nagaoka S., Kamekura M., Usami R. (2010).** *Halarchaeum acidiphilum* gen. nov., sp. nov., a moderately acidophilic haloarchaeon isolated from commercial solar salt. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:2513-2516. *Molecular Bacteriology*. Washington, DC. ASM. P. 791.

**McConnell D. J., Cantwell B. A., Devine K. M., Forage A. J., Laoide B. M., O’Kane C., Ollington J. F. and Sharp P. M. (1986).** Genetic engineering of extracellular enzyme systems of *Bacilli*. *Annual New York Academy of Science*, 469, 1–17.

**McGenity T.J., Gemmell R.T., Grant W.D., Stan-Lotter H. (2000).** Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environ Microbiol* 2: 243-250.

**Moreno M.D.L., Garcia M.T., Ventosa A., Mellado E. (2009).** Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase- and proteaseproducing extreme halophile. *FEMS Microbiol Ecol* 68: 59-71.

**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. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 46: 1-14.

**Moreno M.L., Mellado E., Garcia M.T., Ventosa A. (2007).** Diversity of extreme Halophiles producing hydrolytic enzymes in hypersaline habitats. Halophiles-2007 booklet: 59–60.

**Nagata S., Wang Y., Oshima A., Zhang L., Miyake H., Sasaki H., Ishida A. (2007).** Efficient cyclic system to yield ectoine using *Brevibacterium* sp. JCM 6894 subjected to osmotic downshock. *Biotechnol Bioeng* 99: 941–948.

**Nedashkovskaya O.I., Kim S.B., Lysenko A.M., Frolova G.M., Mikhailov V.V., Bae K.S., Lee D.H., Kim I.S. (2005).** *Gramella echinicola* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:391–394.

**Nordberg P., Von Hofsten B. (1969).** Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. *J Gen Microbiol* 55: 251-256.

**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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1073–1077.

**Ng W. V., Kennedy S. P., Mahairas G. G., Berquist B., Pan M., Shukla H. D., DasSarma S. (2000).** Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc Natl Acad Sci* 97: 12176-12181.

**Oren A. (1983).** A thermophilic amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*, a halophilic bacterium from the Dead Sea. *Curr Microbiol* 8: 225-230.

**Oren A. (1999).** Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 334-348.

**Oren A. (2002a).** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28: 56-63.

**Oren A. (2002b).** Halophilic microorganisms and their environments. In: Seckbach J(ed) *Cellular Origin and Life in Extreme Habitats*. Kluwer Academic, Dordrecht. P. 595.

**Oren A. (2006).** The order *Halobacteriales*. In *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 3*. 3<sup>rd</sup> edition. Edited by: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. New York: *Springer*. 113-164.

**Oren A. (2008).** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4:2.

**Oren A., Gurevich P., Azachi M., Henis Y. (1992).** Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations. *Biodegradation* 3: 387–398.

**Peduzzi R., Tonolla M., Boucher-Rodoni R. (2006).** Milieux extrêmes : Conditions de vie en milieu alpin et milieu marin, Actes et contributions scientifiques : 9.

**Pérez-Pomares F., Bautista V., Ferrer J., Pire C., Marhuenda-Egea F.C., Bonete M.J. (2003).** Alpha-amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles* 7:299–306.

**Piedad Diaz M., Grigson S.J., Peppiatt C.J., Burgess, J.G. (2000).** Isolation and characterization of novel hydrocarbon degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. *Mar Biotechnol* 2: 522–532

**Pikuta E. V. and Hoover R. B. (2007).** Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit. Rev. Microbiol.*, 33, 183-209.

**Prakash B., Vidyasagar M., Madhukumar M.S., Muralikrishna G., Sreeramulu K. (2009b).** Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable  $\alpha$ -amylase from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochem* 44: 210-215.

**Prakash S., Veeranagouga Y., Kyoung L., Sreeramulu K. (2009a).** Xylanase production using inexpensive agricultural wastes and its partial characterization from a halophilic *Chromohalobacter* sp. TPSV101. *Process Biochem* 25: 197-204.

**Priest F. G. (1993).** Systematics and ecology of *Bacillus*. In: Sonenshein A.L., Hoch J. A., Losick R. (Eds.), *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 3–16.

**Quesada E., Bejar V., Valderrama M. J. and Ramos-Cormenzana A. (1987).** Growth characteristics and salt requirement of *Delaya halophila* in a defined medium. *Curr. Microbiol.*, 16, 21-25.

**Quillaguamán J., Delgado O., Mattiasson B., Hatti-Kaul R. (2006).** Poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. *Enz Microbiol Technol* 38: 148–154.

**Quillaguamán J., Muñoz M., Mattiasson B., Hatti-Kaul R. (2007).** Optimizing conditions for poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1 in batch culture with sucrose as carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 981–986.

**Rainey F.A., Zhilina T.N., Boulygina E.S., Stackebrandt E., Tourova T.P., Zavarzin G.A. (1995).** The taxonomic status of the fermentative halophilic anaerobic bacteria: description of *Haloanaerobiales* ord. nov., *Halobacteroidaceae* fam. nov., *Orenia* gen. nov. and further taxonomic rearrangements at the genus and species level. *Anaerobe* 1:185–199.

**Rambaud J-C., Buts J-P., Corthier G., Flourié B. (2004).** Flore microbienne intestinale : physiologie et pathologie digestives. Edn John Libbey Eurotext, Paris. Pp. 3-245.

**Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S. and Deshpande V. V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62:597–635.

**Receveur V., Czjek M., Schulein M., Panine P., Henrissat B. (2002).** Dimension, shape, and conformational flexibility of two domaine fungal cellulases in solution probed by small angle X-ray scattering. *J Biol Chem.* 277 (43): 40887-40892.

- Roberts MF. (2005).** Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* 1:5. doi: 10.1186/1746-1448-1-5.
- Rodriguez -Valera F. (1992).** Biotechnological potential of halobacteria. In: Danson M.J., Hough D.W., Lunt G.G (Edn.), *The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology*. Biochemical Society Symposium n° 58. Biochemical Society, London. Pp. 135–147
- Rodriguez-Valera F. (1993).** Introduction to Saline Environments. In : Vreeland R. H. and Hochstein L. I. (Eds), *The Biology of Halophilic Bacteria*. CRC Press Inc, Boca Raton, Pp. 1 – 23.
- Roßler M., Müller V. (1998).** Quantitative and physiological analyses of chloride dependence of growth of *Halobacillus halophilus*. *Appl Environ Microbiol* 64: 3813-3817.
- Roßler M., Müller V. (2002).** Chloride, a new environmental signal molecule involved in gene regulation in a moderately halophilic bacterium, *Halobacillus halophilus*. *J Bacteriol* 184: 6207-6215.
- Roßler M., Wanner G., Müller V. (2000).** Motility and flagellum synthesis in *Halobacillus halophilus* are chloride dependent. *J Bacteriol* 182: 532-535..
- Rohban R., Amoozgar M.A., Ventosa A. (2009).** Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Ind Microbiol Biotechnol* 36: 333-340.
- Rosselló-Mora R., Amann R. (2001).** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25: 39-67.
- Roussel E.G., Cambon Bonavita M-A., Querellou J., Cragg B.A., Webster G., Prieur D., Parkes R.G. (2008).** Extending the subsea-floor biosphere. *Science* 320 (5879): 1046.
- Riis V., Maskow T., Babel W. (2003).** Highly sensitive determination of ectoine and other compatible solutes by anion-exchange chromatography and pulsed amperometric detection. *Anal Bioanal Chem* 377: 203–207
- Ryu K., Kim J., Dordick J.S. (1994).** Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile. *Enzyme Microb Technol* 16:266–275.
- Saha B.C., Freer S.N., Bothast R.J. (1994).** Production, purification and properties of a thermostable (beta)-glucosidase from a color variant strain from *Aureobasidium pullulans*. *Appl Environ Microbiol* 60(10): 3774-3780.
- Sánchez-Porro C., Martín S., Mellado E., Ventosa A. (2003a).** Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Appl Microbiol* 94: 295-300.
- Sánchez-Porro C., Mellado E., Bertoldo C., Antranikian G., Ventosa A. (2003b).** Screening and characterization of the protease CPI produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76. *Extremophiles* 7: 221-228.
- Sánchez-Porro C., Martín S., Mellado E., Ventosa A. (2002).** Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *J Appl Microbiol* 94:295–300.
- Sapin J. (2009).** L'archéologie de la mer Morte, géographie et climat de la mer Morte. *Revue d'archéologie et d'histoire* : 1-63.

- Santos C.A., Vieira A.M., Fernandes H.L., Empis J.A., Novais J.M. (2001).** Optimisation of the biological treatment of hypersaline wastewater from *Dunaliella salina* carotenogenesis. *J Chem Technol Biotechnol* 76: 1147–1153.
- Sarethy I. P., Saxena Y., Kapoor A., Sharma M., Sharma S. K., Gupta V. and Gupta S. (2011).** Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38:769–790.
- Saxena K.R., Dutt K., Agarwal L., Nayyar P. (2007).** A highly and thermostable alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technol* 98:260–265.
- Schallmeyer M., Singh A. and Ward O. P. (2004).** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.*, 50: 1-17.
- Schallmeyer M., Singh A. and Ward O. P.(2004).** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.*, 50: 1-17.
- Seckbach J. and Chela-Flores J. (2007).** Extremophiles and chemotrophs as contributors to astrobiological signatures on Europa: A review of biomarkers of sulfate-reducers and other microorganisms. In: R.B. Hoover, G.V. Levin, A.Y. Rozanov, and P.C.W. Davies (eds.), *Instruments, Methods, and Missions for Astrobiology X*. Proc. SPIE 6694: 66940W.
- Setati M.E. (2010).** Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria. *Afr J Biotechnol* 9 (11): 1555-1560.
- Shafiei M., Ziaee A-A., Amoozegar M.A. (2010).** Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting, and halophilic  $\alpha$ -amylase from a moderately halophilic bacterium, *Nesterenkonia* sp. strain F. *Process Biochem*: 1-36.
- Shimane Y., Hatada Y., Minegishi H., Mizuki T., Echigo A., Miyazaki M., Ohta Y., Usami R., Grant W.D., Horikoshi K. (2010).** *Natronoarchaeum mannanyticum* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic archaeon isolated from commercial salt. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:2529-2534.
- Shimane Y., Hatada Y., Minegishi H., Echigo A., Nagaoka S., Miyazaki M., Ohta Y., Maruyama T., Usami R., Grant W.D., Horikoshi K. (2011).** *Salarchaeum japonicum* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the Archaea isolated from commercial salt. *Int J Syst Evol Microbiol* 61(9):2266-2270.
- Sierra G. 1957.** A Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 23:15-22.
- Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Bacteriol* 47:79–491.
- Smith N. R., Gordon R. E. and Clark F. E. (1952).** Aerobic spore-forming bacteria. *U.S. Dept. Agr. Monogr.* N°16. Washington, D.C. USA.

**Tan T.C., Mijts B.N., Swaminathan K., Patel B.K.C., Divne C. (2008).** Crystal structure of the polyextremophilic  $\alpha$ -amylase AmyB from *Halothermothrix orenii*: Details of a productive enzyme-substrate complex and an N domain with a role in binding raw starch. *J Mol Biol* 378: 852-870.

**Tapingkae W., Tanasupawat S., Itoh T., Parkin K.L., Benjakul S., Visessanguan W., Valyasevi R. (2008).** *Natrinema gari* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from fish sauce in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 2378–2383.

**Tanja Beric., Milan Kojic. ;Slavisa Stankovic(2012).** antimicrobial activity of *Bacillus* sp. Natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* 50(1) 25-31.

**Thongthai C., McGenity T.J., Suntainalert P., Grant W.D. (1992).** Isolation and characterization of an extremely halophilic archaeobacterium from traditionally fermented Thai fish sauce (nam pla). *Lett Appl Microbiol* 14: 111–114.

**Vaisman N., Oren A. (2009).** *Salisaeta longa* gen. nov., sp. nov., a red, halophilic member of the Bacteroidetes. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2571–2574.

**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.

**Ventosa A., Garcia M. T., Kamekura M., Onishi H. and Ruiz- Berraquero F. (1989).** *Bacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic *Bacillus* species. *Syst Appl Microbiol* 12: 162–165.

**Ventosa A., Garcia M. T., Kamekura M., Onishi H., and Ruiz-Berraquero F. (1990).** *Bacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic *Bacillus* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 401- 405.

**Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. (1998).** Biology of aerobic moderately halophilic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 504–544.

**Van den Burg B. (2003).** Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol* 6: 213-218

**Vidyasagar M., Prakash S., Litchfield C., Sreeramulu K. (2006).** *Archaea* 2: 51–57.

**Vidyasagar M., Prakash S., Mahajan V., Shouche Y.S., Sreeramulu K. (2009).**

**Wang C-Y., Ng C-C., Tzeng W-S., Shyu Y-T. (2009).** *Marinobacter szutsaonensis* sp. nov., isolated from a solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2605–2609.

**Waino M. and Ingvorsen K. (2003).** Production of  $\beta$ -xylanase and  $\beta$ -xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*, *Extremophiles*, 7: 87-93.

**Weber A. P. M., Oesterhelt C., Gross W., Brautigam A., Imboden L. A., Krassovskaya I. 2004.** EST-analysis of the thermo-acidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* reveals potential for lipid A biosynthesis and unveils the pathway of carbon export from rhodoplasts. *55: 17-32.*

**Wejse P.L., Ingvorsen K., Mortensen K.K. (2003).** Purification and characterization of two extremely halotolerant xylanases from a novel halophilic bacterium. *Extremophiles* 7: 423-431.

**Woese C. R., Magrum L. J. and Fox G. E. (1978).** *Archaeobacteria*. *Journal of Molecular Evolution*, 11: 245-251.

**Woese C. R. (1987).** Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221- 271.

**Ye Z.W., Jiang J.G., Wu G.H. (2008).** Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progress and prospects. *Biotechnol Adv* 26: 352–360.

**Yachai M. (2009).** Carotenoid production by halophilic Archaea and its applications. Thesis of Doctorat, university Prince of Songkla. P. 173.

**Yoon J. H., Kang K. H. and Park Y. H. (2003.)** *Halobacillus salinus* sp. nov., isolated from a salt lake on the coast of the East Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 687–693.

**Yoon J. H., Kim I. G., Kang K. H., Oh T. K. and Park Y. H. (2004).** *Bacillus hwajinpoensis* sp. nov. and an unnamed *Bacillus* genom-species, novel members of *Bacillus* rRNA group 6 isolated from sea water of the East Sea and the Yellow Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 803-808.

**Zalar P., de Hoog G.S., Gunde-Cimerman N. (1999).** Ecology of halotolerant *dothideaceous* black yeasts. *Studies in Mycology* 43: 38–48.

**Zakhia F., De Lajudie P. (2006).** La taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Can J Microbiol* 52: 169-181.

**Zhi X.Y., Li W.J., Stackebrandt E. (2009).** An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 589–608.

**Zhang L., Wang Y., Dai J., Tang Y., Yang Q., Luo X. and Fang C. (2009).** *Bacillus korlensis* sp. nov., a moderately halotolerant bacterium isolated from a sand soil sample in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1787–1792.

**Zhilina T.N., Zavarzin G.A., Rainey F., Kevrim V.V., Kostrikina N.A., Lysenko A.M.(1996).** *Spirochaeta alkalica* sp. nov., *Spirochaeta africana* sp. nov., and *Spirochaeta asiatica* sp. nov., alkaliphilic anaerobes from the continental soda lakes in Central Asia and the East African Rift. *Int J Syst Evol Microbiol* 46: 305–312.

# **Annexe**

➤ **Milieux de culture liquides**

**Bouillon nutritif**

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

pH = 7,2

**Bouillon Nitraté**

Peptone .....	5 g
Extrait de bœuf .....	3 g
KNO <sub>3</sub> .....	1 g
Eau distillée .....	1000ml

pH = 7

➤ **Milieux de culture solides**

**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 Amidon**

Gélose nutritive .....	100ml
Amidon .....	01g

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

Gélose nutritive .....	90 ml
Emulsion de jaune d'œuf .....	10 ml

#### Préparation de l'émulsion de jaune d'œuf

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

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

### Gélose au lait

#### Préparation 1

Lait écrémé poudre .....	05g
Eau distillée .....	50ml

Stérilisation par autoclave à 121°C / 20min

#### Préparation 2

Agar .....	01g
Eau distillée .....	50ml

Stérilisation par autoclave à 121°C / 20min

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

### Milieu pour la mise en évidence de l'hydrolyse de tween 80

Extrait de levure .....	5 g
NaNO <sub>3</sub> .....	1 g
Solution saline .....	50 ml
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O .....	0,1 g
Tween 80 .....	10 ml
Agar .....	8 g
Eau distillée .....	1000 ml

pH = 7,2

### Milieu Mannitol-Mobilité

Peptone .....	20 g
Nitrate de potassium .....	1 g
Mannitol .....	2 g
Rouge de phénol .....	40 mg
Agar .....	4 g
Eau distillée .....	1000 ml

pH = 8,1

### Gélose viande-foie

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

pH = 7,6

## ➤ Solutions

### Eau physiologique

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

➤ **Tableau de lecture de la galerie Api 20<sup>E</sup>**

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



