

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Université Mentouri-Constantine
Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies
Agro-Alimentaires (I.N.A.T.A.A)
Département de Biotechnologie Alimentaire

N° d'ordre :
Série :

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Sciences Alimentaires

Option: Biotechnologie Alimentaire

*Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires
chez des microorganismes halophiles aérobies isolés
d'environnements hypersalins de l'Est algérien*

Par

AYAD Rima

Devant le jury composé de :

Présidente :	Pr. MEKHANCHA-DAHEL C.C.	Professeur	INATAA, UMC
Promotrice :	Dr. KHARROUB K.	Docteur	INATAA, UMC
Examinatrices :	Dr. BARKAT M.	Docteur	INATAA, UMC
	Dr. BEKHOUCHE F.	Docteur	INATAA, UMC

Remerciements

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

Je suis particulièrement reconnaissante au Professeur Mekhancha-Dahel Corinne, aux docteurs Barkat Malika et Bekhouche Farida d'avoir accepté de juger mon travail.

Je tiens à remercier plus particulièrement le Docteur Kharroub Karima d'avoir accepté la charge de Directrice de mémoire et de m'avoir permis de mener à bien ce travail grâce à son soutien de chaque instant, sa générosité, ses conseils et sa gentillesse. J'ai eu vraiment un grand honneur de travailler sous sa direction.

J'adresse également ma profonde amitié à Mr Gomri Mohamed Amine qui m'a beaucoup aidé. Merci Amine pour ton accueil, tes conseils avisés et ta contribution à ce travail, j'ai eu de la chance et de l'honneur de travailler avec toi.

Je ne saurais oublier Melle Djabali Saliha, Melle Zoubiri Lamia, Mr Bouguerra Ali et Mr Zouaoui Nassim pour leur aide précieuse dans la réalisation de ce travail, leur bonne humeur et leur soutien amical inébranlable. J'adresse ici un vif remerciement à Mrs Bouasla Abdallah et Yahyaoui Ahmad Abd Rahim pour leur aide et leur gentillesse et qu'ils savent bien que tous les mots de remerciements ne suffisent jamais pour leur montrer à quel point ils m'ont fait un grand plaisir.

Un grand merci aux techniciens de laboratoire de microbiologie pour tous les moments de travail (ou de détente) passés au laboratoire et à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je remercie enfin mes parents, mon oncle Seddik, mes sœurs Dalel, Radia, Fatima et Meriem et mes deux petits frères Mohammed et Ibrahim pour leur soutien constant et leurs encouragements durant cette période de travail.

RIMA AYAD

Sommaire

	Page
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Revue bibliographique	
1. Environnements salins et hypersalins	3
1.1. Environnements thalassohalins	3
1.2. Environnements athalassohalins	4
1.3. Sols salés	5
2. Microorganismes halotolérants et halophiles	6
3. Diversité phylogénétique des halophiles	6
3.1. Eucaryotes halophiles	7
3.2. Archaea halophiles.....	8
3.3. Bactéries halophiles	9
3.3.1. Phylum <i>Proteobacteria</i>	9
3.3.2. Phylum <i>Firmicutes</i>	9
3.3.3. Phylum <i>Actinobacteria</i>	10
3.3.4. Phylum <i>Spirochètes</i>	10
3.3.5. Phylum <i>Bacteroidetes</i>	10
4. Diversité métabolique des halophiles.....	10
5. Base moléculaire de l'osmoadaptation	11
5.1. Accumulation de KCl.....	12
5.2. Accumulation de solutés compatibles	12
6. Biotechnologies des halophiles	13
6.1. Enzymes	13
6.1.1. Amylases	13
6.1.2. Protéases.....	14
6.1.3. Xylanases.....	15
6.1.4. Cellulases.....	15
6.1.5. Estérases et lipases.....	16
6.1.6. Nucléase H.....	17
6.2. Solutés compatibles.....	17
6.3. Production de biopolymères.....	17

6.4. Production de β -carotène par <i>Dunaliella</i>	18
6.5. Bactériorhodopsine.....	18
6.6. Production de sel	18
6.7. Fermentation des aliments	19
6.8. Traitement des eaux usées salines	19
6.9. Production de Biocarburants	20
6.10. Biodégradation	20
7. Taxonomie polyphasique et notion d'espèce	21
7.1. Taxonomie phénétique	22
7.2. Taxonomie numérique	22
7.3. Taxonomie génotypique	22

Matériel et méthodes

1. Sites d'étude et échantillonnage	23
1.1. Sites d'étude	23
1.2. Echantillonnage	24
2. Isolement, purification et conservation des souches	25
3. Caractérisation phénétique des isolats	25
3.1. Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies	25
3.2. Caractérisation physiologique des isolats	26
3.2.1. Salinité	26
3.2.2. Température	26
3.2.3. pH	26
3.2.4. Utilisation des substrats carbonés par les isolats.....	26
3.3. Caractérisation biochimique des isolats	26
3.3.1. Mise en évidence des enzymes respiratoires.....	26
3.3.1.1. Cytochrome-oxydase	26
3.3.1.2. Catalase	27
3.3.2. Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons	27
3.3.3. Recherche de la β -galactosidase	27
3.3.4. Recherche de la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et l'arginine dihydrolase	27
3.3.5. Croissance sur le milieu Triple Sugar Iron (TSI).....	28
3.3.6. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité.....	28
3.3.7. Production d'indole	28
3.3.8. Réactions de Voges Proskauer (VP) et au Rouge de Méthyle (RM).....	28
3.3.9. Recherche de l'uréase.....	29
3.4. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires.....	29
3.4.1. Détermination de l'activité amylolytique.....	29
3.4.2. Détermination de l'activité protéolytique.....	29
3.4.3. Détermination de l'activité lipolytique.....	30
3.4.4. Détermination de l'activité cellulolytique (CMCase).....	30

4. Taxonomie numérique.....	30
-----------------------------	----

Résultats et discussion

1. Caractérisation physico-chimique des échantillons	33
2. Caractérisation phénétique des isolats.....	33
2.1. Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies	35
2.3. Caractérisation physiologique des isolats	40
2.3.1. Salinité	41
2.3.2. Température	41
2.3.3. pH	41
2.3.4. Utilisation des substrats carbonés par les isolats.....	45
2.4. Caractérisation biochimique des isolats	50
2.4.1. Mise en évidence des enzymes respiratoires.....	50
2.4.2. Utilisation de citrate sur le milieu au citrate de Simmons	50
2.4.3. Recherche de la β -galactosidase	50
2.4.4. Recherche de la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et l'arginine dihydrolase.....	51
2.4.5. Croissance sur le milieu Triple Sugar Iron (TSI).....	51
2.4.6. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité.....	51
2.4.7. Production d'indole.....	51
2.4.8. Réactions de Voges Proskauer (VP) et au Rouge de Méthyle (RM).....	51
2.4.9. Recherche de l'uréase.....	51
2.4.10. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires.....	52
3. Taxonomie numérique.....	61
4. Discussion.....	67

Conclusion générale et perspectives.....	70
---	-----------

Références bibliographiques.....	72
---	-----------

Annexes

Résumés

Communications scientifiques

Liste des abréviations

ADH: Arginine Dihydrolase
ADN: Acide désoxyribonucléotidique
ARN: Acide ribonucléotidique
ARNr 16S: Acide ribonucléique codant pour la petite sous-unité 16S de l'ARN ribosomal
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
C: Cytosine
CaCl₂: Chlorure de calcium
DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
EC: Enzyme Commission numbers
FeCl₃: Tri-chlorure de fer
G: Guanine
GMP: Guanosine monophosphate
KCl: Chlorure de potassium
kDa: kilodalton
KH₂PO₄: Dihydrogénophosphate de potassium
LDC: Lysine Décarboxylase
M: Molarité
MgCl₂: Chlorure de magnésium
Na₂CO₃: Carbonate de sodium
Na₂HPO₄: Di-sodium hydrogénophosphate
NaBr: Bromure de sodium
NaCl: Chlorure de sodium
NaH₂PO₄: Dihydrogénophosphate de sodium
NaHCO₃: Hydrogénocarbonate de sodium
NaOH: Hydroxyle de sodium
NH₄Cl: Chlorure d'ammonium
NRC: National Research Council, (Ottawa, Canada)
ODC: Ornithine Décarboxylase
S_{SM}: Simple Matching Similarity
UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

Liste des figures

	Page
Figure 1. Environnements thalassohalins: Marais salants à Formentera en Espagne et de l'île de Ré en France.....	4
Figure 2. Environnements athalassohalins: la Mer Morte et le Lac Rose Salé au Sénégal.....	4
Figure 3. 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	7
Figure 4. Photographies des sites étudiés. A, Sebkha Ezzemoul; B, Chott Melghir; C, Oued Righ et D, Sidi Mahdi	24
Figure 5. Exemples d'aspects macroscopiques des isolats cultivés sur le milieu HM. A, Souche Ez39 et B, Souche Ez46. Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Ericsson Cyber-shot DSC (zoom x2)	35
Figure 6. Exemples d'observations microscopiques de la coloration de Gram à l'immersion (x100). A, Souche Ez2. B, Souche Ez14. C, Souche OR1 et D, Souche MS10. Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Cyber shot DSC-W530 (zoom x4).....	36
Figure 7. Exemples de mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires. A. Hydrolyse de l'amidon par la souche OR1; B. Hydrolyse de la gélatine par la souche Ez18. Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Ericsson Cyber-shot DSC (zoom x2).....	52
Figure 8. Effectifs des souches ayant pu hydrolyser les polymères tests, réparties selon leur lieu d'isolement.....	53
Figure 9. Répartition des souches étudiées par type et fréquence de production des hydrolases extracellulaires.....	53
Figure 10. Effectifs des souches à Gram positifs et négatifs ayant pu hydrolyser les polymères testés.....	54
Figure 11. Dendrogramme simplifié basé sur le coefficient « simple matching » (S_{SM}) montrant les relations phénotypiques entre les isolats à Gram positifs et les souches de référence.....	63
Figure 12. Dendrogramme simplifié basé sur le coefficient « simple matching » (S_{SM}) montrant les relations phénotypiques entre les isolats à Gram négatifs et les souches de référence.....	66

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1. Composition ionique d'environnements thalassohalins et athalassohalins.....	5
Tableau 2. Souches de référence utilisées pour la taxonomie numérique	31,32
Tableau 3. Caractères phénotypiques des souches de référence à Gram positifs utilisés lors de l'analyse numérique (Annexe 2)	
Tableau 4. Caractères phénotypiques des souches de référence à Gram négatifs utilisés lors de l'analyse numérique (Annexe 2)	
Tableau 5. Valeurs de salinité et de pH des échantillons.....	33
Tableau 6. Répartition des souches pures selon leur provenance (échantillon et site).....	34
Tableau 7. Caractérisation morphologique des isolats.....	37-40
Tableau 8. Salinité, température et pH.....	42-45
Tableau 9. Utilisation des substrats carbonés par les isolats.....	46-50
Tableau 10. Caractérisation biochimique des isolats.....	55-60
Tableau 11. Milieux de culture utilisés pour la caractérisation physiologique et biochimique (Annexe 1)	
Tableau 12. Milieux de culture utilisés pour la recherche des activités hydrolytique extracellulaires (Annexe 1)	

Introduction

Les formes de vie sur Terre sont innombrables, comme les environnements qui les abritent. Jusqu'au 20^{ème} 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 trouver 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).

Les organismes qui se développent dans ces biotopes "hostiles" sont globalement qualifiés d'extrêmophiles (Costenaro, 2001). Les premiers organismes extrêmophiles 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).

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 athalassohalins d'où leur polyextrêmophilie, 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 Boutaïba *et al.* (2011) visant à examiner et à comparer les propriétés physicochimiques et biologiques des lacs salés de Sidi Ameer et Himalatt situés dans le Sud du pays. Par ailleurs, un des sites de cette étude, la sebkha Ezzemoul a fait l'objet d'une thèse de doctorat dans la quelle l'auteur a isolé de nombreuses espèces archéennes et bactériennes halophiles dotées d'activités hydrolytiques (Kharroub, 2007).

L'objectif de ce présent travail est un screening d'activités hydrolytiques extracellulaires de microorganismes halophiles aérobies hétérotrophes isolés de quatre environnements hypersalins algériens (Sebkha Ezzemoul, Chott Melghir, Oued Righ et Sidi Mahdi).

Pour répondre à cet objectif différentes étapes doivent être réalisées:

- Isolement et caractérisation phénétique 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

Notre travail est structuré en trois parties dont la première est une revue bibliographique traitant les environnements salins et hypersalins, les microorganismes halophiles qui les hébergent, leurs diversités métabolique et phylogénétique, leur adaptation osmotique aux fortes salinités ce qui révèle leur atout biotechnologique. Les techniques courantes de taxonomie polyphasique sont également évoquées à la fin de cette partie. La seconde partie rapporte la méthodologie détaillée du travail et la troisième expose nos résultats obtenus comparés et discutés suivie d'une conclusion générale et des perspectives.

Revue

bibliographique

1. Environnements salins et hypersalins

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).

1. 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 (CaCO_3), le gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), la halite (NaCl), la sylvite (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).

Des exemples d'environnements thalassohalins sont représentés par le Grand Lac Salé, Utah (USA), les marais salants en France et en Espagne, etc. (Litchfield et Gillevet, 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 1. 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)

1. 2. Environnements athalassohalins

Les eaux athalassohalines 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).



Figure 2. Environnements 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 Egypte (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 1. Composition ionique d'environnements thalassohalins et athalassohalins.

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

1.3. Sols salés

Selon Kaurichev (1980), les sols salés ou sols halomorphes sont caractérisés par une concentration en sels solubles supérieure à 0,2 % (p/v) (Kharroub, 2007).

Ces sols ont une grande extension dans les trois pays du Maghreb. Elle est due aux conditions arides ou semi-arides d'une grande partie de cette région où les possibilités d'évaporation sont considérables et les précipitations pluviales limitées (Aubert, 1975). Des plantes dites halophytes se sont adaptées à de telles conditions de croissance.

En Algérie, il n'y a aucune étude cartographique fiable et précise permettant de délimiter les zones touchées par la salinité ni une quantification de la teneur des sels des sols. Néanmoins il existe quelques données fragmentaires qui donnent une idée générale sur le phénomène de

salinité des terres. Ainsi d'après Szablocs (1989), 3,2 millions d'hectares subissent à des degrés de sévérité variables, le phénomène de salinisation dont une bonne partie se trouve localisée dans les régions steppiques où ce processus est plus marqué du fait des températures élevées durant presque toute l'année, du manque d'exutoire et de l'absence de drainage efficient.

Ce phénomène est observé dans les plaines et vallées de l'Ouest du pays (Mina, Cheliff, Habra Sig, Maghnia) dans les hautes plaines de l'Est (Constantine, Sétif, Bordj Bou Arreridj, Oum El Bouagui), aux abords des Chotts et de Sebkhas (Chott Ech Chergui, Chott Gharbi, Chott Hodna, Chott Melghir, Sebkha d'Oran, de Benziane, Zemmoul, Zazhrez Gharbi et Chergui, etc.) et dans le grand Sud (Oasis, le long des oueds, etc.) (INSID, 2008).

2. Microorganismes halotolérants et halophiles

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.

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 3). L'augmentation de la salinité s'accompagne d'une réduction de la diversité des communautés microbiennes (Oren, 2002a).

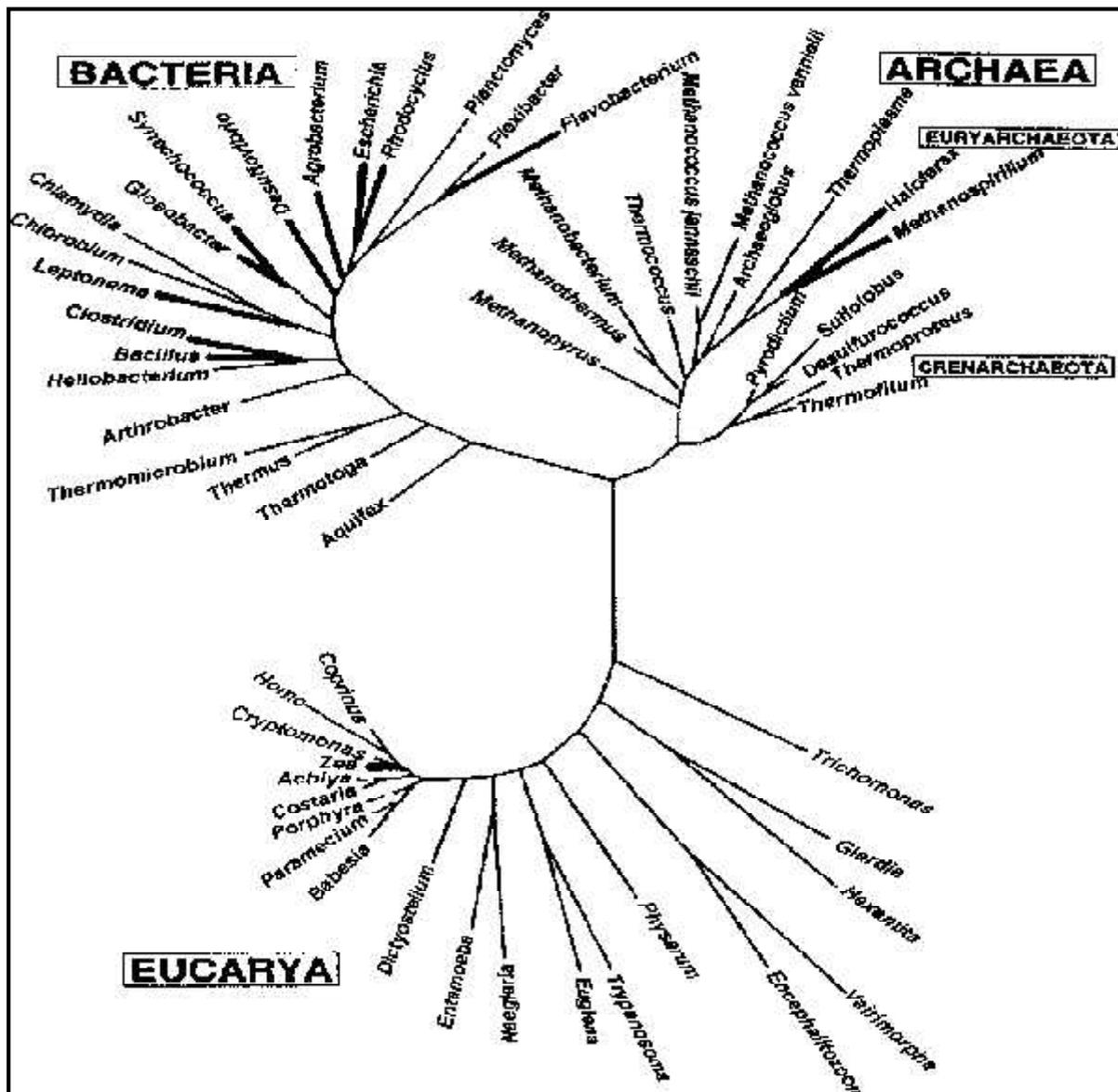


Figure 3. Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative des séquences de gènes ribosomiaux. Les groupes phylogénétiques contenant des membres halotolérants et halophiles (croissent bien à 100 g/l) sont indiqués en lignes gras (Oren, 2002a).

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 β -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*, *Phaeothea 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*, *Halogranum*, *Halobellus*, *Halorientalis* (Cui *et al.*, 2010a; 2010b; 2010c; 2011a;

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 (Roeßler et Müller, 1998; 2002; Dohrmann et Müller, 1999; Roeßler *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. 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).

5. Base moléculaire de l'osmoadaptation

Une diversité considérable existe également dans les mécanismes d'adaptation des microorganismes halophiles et halotolérants à la forte pression osmotique exercée par leur milieu environnant fortement salin. Comme les membranes biologiques sont perméables pour l'eau, tous les microorganismes doivent maintenir leur cytoplasme au moins isoosmotique avec leur environnement (Oren, 1999). Parmi les stratégies adoptées par ces derniers:

5.1. 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 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 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).

5.2. Accumulation de solutés compatibles

Cette stratégie consiste à exclure le sel du cytoplasme, et à accumuler des solutés organiques pour assurer l'équilibre osmotique. Elle est adoptée par les membres du domaine *Bacteria*.

Il existe une large variété de solutés compatibles à savoir le glycérol, les sucres alcools, la glycine bêtaïne, l'ectoïne et son dérivé 5-hydroxy, les sucres simples, etc. (Galinski, 1995).

Ces composés sont synthétisés par l'organisme ou importés de l'environnement externe sans interférer avec son métabolisme. Plusieurs études ont prouvé que les osmolytes tels que les ectoïnes protègent l'organisme de différents stress (thermique et salin) (Bursy et al., 2008; Vargas et al., 2008).

6. Biotechnologies des halophiles

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; Karbalaie-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. (Karbalaie-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- β -D-xylane xylanohydrolase, EC.3.2.1.8) sont les enzymes qui hydrolysent les liaisons β (1, 4) entre deux résidus β -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 β -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

Arikan, 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 d'*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 ultra-violet 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 β -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 β -hydroxyalcanoate (PHA), un polymère contenant des unités de β -hydroxybutyrate et β -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 β -carotène par *Dunaliella*

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

Le pigment β -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 antioxydantes 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 β -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 β -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 (Kleinsteuber *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. 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)

L'espèce représente l'unité de base de la classification du vivant. Prévot en 1933, proposa la définition de l'espèce comme un «ensemble de clones identiques entre eux, définis par leur morphologie, leur physiologie, leurs propriétés biochimiques et pathogéniques, en bref, une mosaïque d'enzymes et d'antigènes, tronçon d'évolution mesurable à partir du moment où on l'isole, jusqu'au moment où elle commence à donner des mutants» (Alauzet, 2009).

Selon Rosselló-Mora et Amann (2001), l'espèce procaryote peut être définie comme «un groupe monophylétique et génomiquement cohérent d'organismes individuels présentant un niveau de similitude globalement élevé pour de nombreuses caractéristiques indépendantes, et détectables par une propriété phénotypique discriminante».

7.1. 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).

7.2. 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).

7.3. 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 DasSarma, 2008).

Matériel et méthodes

Ce présent travail a été réalisé durant la période de Février à Septembre au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie à l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (I.N.A.T.A.A), Université Mentouri-Constantine.

1. Sites d'étude et échantillonnage

1.1. Sites 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, quatre sites de prélèvements différents ont été ciblés (Figure 4):

➤ Sebkhia Ezzemoul: localisée dans la région de Ain M'Lila (wilaya d'Oum El Bouaghi). Elle est située dans la dépression formée par la gamme côtière des montagnes, au Nord, la petite Kabylie et au Sud le massif de l'Aurès (35°53'N, 6°30'E). Soit à 800 mètres au Sud- Est de la route nationale principale (N3) reliant Constantine à Batna qui la sépare du chott de Tinnsilt. Elle a une superficie de 4400 hectare et une profondeur de 0,6 mètre (Kharroub, 2007).

➤ Chott Melghir: situé au Sud-Est de la ville de Biskra (34°30'N, 6°30'E). Il est limité au Nord par la Daïra de Zeribet et Sidi Okba, à l'Est par les wilayas d'El Oued et de Khenchela et à l'Ouest par la commune d'El Haouch. Il fait partie de la wilaya d'El Oued (Boumezbear, 2003).

➤ Chott de Oued Righ: situé dans le Sud- Est (34°9'N, 32°54'E). Il s'étale sur 150 km de longueur et 20 à 30 km de largeur et fait partie des wilayas d'El-Oued et de Ouargla. Cette région est caractérisée par une dépression allongée du Sud au Nord, la côte la plus haute est de +100 m dans El-Goug en amont et -30 m dans le chott Merouane en aval. Grâce à la disponibilité en eau, et aux conditions climatiques, Oued Righ est la première région dattière au Sahara algérien par la quantité (1,7 million de palmiers) et la qualité (forte proportion de Deglet Nour) (Cote, 1999; Fantazi, 2001).

➤ Site de Sidi Mahdi: situé dans la banlieue Sud de la ville de Touggourt-Ouargla (6°5'N, 33°3'E), le site est constitué de sebkhas et situé près d'une source chaude (Tabouche et Achour, 2004).

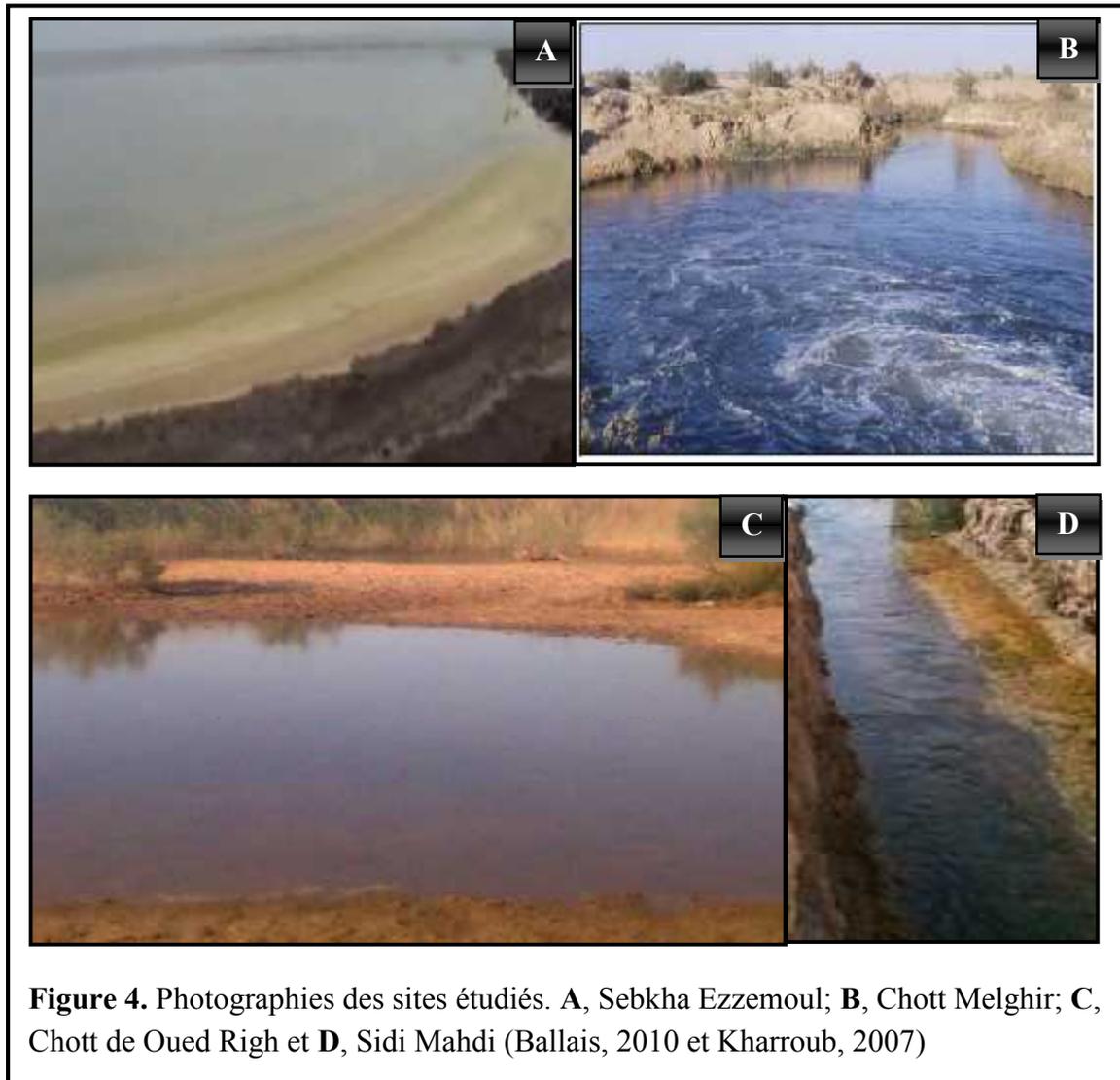


Figure 4. Photographies des sites étudiés. **A**, Sebkha Ezzemoul; **B**, Chott Melghir; **C**, Chott de Oued Righ et **D**, Sidi Mahdi (Ballais, 2010 et Kharroub, 2007)

1.2. Echantillonnage

Des échantillons d'eau sont prélevés à partir de la sebkha Ezzemoul et de Oued Righ et récupérés dans des flacons en verre stériles.

Pour le prélèvement de sel et de sédiments, une quantité est prélevée jusqu'à 15 cm de profondeur après avoir écarté les trois premiers centimètres, puis déposée à l'aide d'une spatule stérile sur une feuille d'aluminium stérile. Le transport et la conservation des échantillons ont lieu à 4°C.

Les mesures du pH et de la salinité sont réalisées à l'aide d'un pH-mètre (JENWAY) et d'un réfractomètre (FG-108), respectivement. Le pH des sédiments est déterminé selon la technique décrite par Pochon et Tradieux (1962). Elle consiste à mesurer le pH d'une suspension de sédiment en eau distillée (5g de sédiments dans 12,5ml d'eau distillée) (Bensmira, 2006).

2. Isolement, purification et conservation des isolats

L'isolement des souches microbiennes halophiles est effectué sur le milieu HM (Halophilic Medium) de Torreblanca *et al.*, (1986) composé de 5g/l d'extrait de levure et 5g/l de peptone et à différentes concentrations salines (5%, 7,5%, 10%, 20% ou 25%, p/v).

Le stock de sel à 30% (p/v) qui a servi à la préparation des solutions salines est préparé à partir de la composition de Subov (1931): NaCl, 234g; MgCl₂.6H₂O, 42g; MgSO₄.7H₂O, 60g; KCl, 6g; CaCl₂.2H₂O, 1g; NaBr, 0,7g; NaHCO₃, 0,2 g; FeCl₃, 0,005g et complété à 1000 ml avec de l'eau distillée. C'est un milieu complet qui contient tous les composants nécessaires à cette catégorie de microorganismes.

Les milieux de culture solides sont obtenus par addition de 22g/l d'agar-agar. Le pH du milieu est ajusté à 7,2 à l'aide d'une solution de NaOH 4M.

Ces milieux ont servi à la fois pour l'isolement, et aussi de base pour les différents tests réalisés.

0,1ml de la solution mère ou de ses dilutions (de 10⁻¹ à 10⁻³) est étalé sur le milieu solide ensuite les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C jusqu'à apparition de colonies.

Les solutions mères de sel et des sédiments sont préparées en inoculant 9 ml d'une solution saline à différentes concentrations de sel avec 1g de l'échantillon, puis agités au vortex deux fois pendant 5 minutes.

Les colonies à différents aspects macroscopiques sont sélectionnées, purifiées par repiquage successifs sur le même milieu d'isolement. Elles sont ensuite conservées à 4°C.

3. Caractérisation phénétique des isolats

La caractérisation phénétique est réalisée dans les conditions optimales pour chaque isolat (salinité, température et pH). Elle est faite sur la base des tests proposés pour la description de nouveaux taxons dans l'ordre des *Halobacteriales* (Oren *et al.*, 1997) et de la famille des *Halomonadaceae* (Arahal *et al.*, 2007).

Sauf indication, l'incubation des cultures est faite à 37°C pendant 2 à 7 jours et le pH est ajusté à 7,2.

Les milieux de culture utilisés au cours de la caractérisation sont préparés en remplaçant l'eau distillée par une solution saline correspondante à chaque souche.

3.1. Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies

La morphologie des colonies (pigmentation, diamètre, aspect, etc.) est déterminée sur milieu solide.

La morphologie et l'arrangement cellulaire sont déterminés par la coloration de Gram modifiée par Dussault (1955) par application, après fixation, d'une solution d'acétate à 2% (v/v) pendant 5 minutes. L'observation est effectuée à l'immersion à l'aide d'un microscope photonique (Exacta+ Optech).

3.2. Caractérisation physiologique des isolats

L'influence sur la croissance de la salinité, de la température et du pH est déterminée en variant un des paramètres alors que les deux autres sont maintenus constants.

3.2.1. Salinité

La croissance à différentes concentrations finales de sel (0%, 3%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20%, 25% ou 30%, p/v) est examinée à pH 7,2.

3.2.2. Température

L'incubation des milieux solides à pH 7,2 ensemencés a lieu à 30; 37; 40; 45; 50; 55 et 60°C.

3.2.3. pH

L'intervalle de pH de croissance a été déterminé par ensemencement des milieux gélosés sur une gamme s'étalant de 5,0 à 10,0.

3.2.4. Utilisation des substrats carbonés par les isolats

Les milieux solides utilisés sont dépourvus de toute source organique, additionnés de NH₄Cl (0,5 g/l), de KH₂PO₄ (0,005 g/l) et ont un pH optimum. Les substrats sont rajoutés à une concentration finale de 1 % pour les sucres et 0,1 % pour les alcools, les acides organiques et l'acide aminé (Oren *et al.*, 1997).

Les substrats utilisés sont: glucose, galactose, fructose, lactose, maltose, mélibiose, saccharose, mannitol, lactate, acétate, oxalate, glycine et glycérol.

3.3. Caractérisation biochimique des isolats

3.3.1. Mise en évidence des enzymes respiratoires

3.3.1.1. Cytochrome-oxydase

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

diamine-dichlorure. Une partie de la colonie est prélevée à l'aide de l'effilure d'une pipette Pasteur et dissociée sur le papier filtre imbibé d'eau distillée.

La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (Gerhardt *et al.*, 1994).

3.3.1.2. 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).

3.3.2. Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons

La capacité des souches à assimiler le citrate comme unique source de carbone et d'énergie est testée sur un milieu synthétique au citrate de Simmons.

Après incubation, la croissance sur ce milieu s'accompagne généralement d'une alcalinisation provoquant le virage de couleur du vert au bleu vif (Harley et Prescott, 2002).

3.3.3. Recherche de la β -galactosidase

Des suspensions denses de culture sont préparées dans des solutions salines optimales correspondantes à chaque souche puis un disque imprégné d'Ortho-Nitro-Phényl- β -Galactoside (ONPG) est ajouté à chaque suspension. Après incubation pendant 18 à 24 heures, l'apparition d'une coloration jaune indique l'hydrolyse de l'ONPG et en conséquence la présence de la β -galactosidase (Joffin et Leyral, 2006). 28 souches uniquement sont testées pour l'hydrolyse de l'ONPG.

3.3.4. Recherche de la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et l'arginine dihydrolase

Ces enzymes, dont l'action est favorisée en milieu acide, forment des substances alcalines à partir des acides aminés.

Les milieux utilisés ne contiennent qu'un seul acide aminé, lysine, ornithine ou arginine. Quatre tubes contenant le bouillon de Moeller dont un est un témoin sont inoculés avec une suspension microbienne.

Après incubation, une réaction négative se traduit par une coloration jaune (acidification du milieu) alors que l'apparition d'une coloration violette (alcalinisation du milieu) révèle une réaction positive (Guiraud, 1998).

3.3.5. Croissance sur le milieu Triple Sugar Iron (TSI)

La gélose Triple Sugar Iron permet la mise en évidence de la fermentation du glucose (avec ou sans production de CO₂), l'oxydation du lactose et/ou du saccharose et la production de sulfure d'hydrogène.

L'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu se traduit par une acidification, jaunissement du culot dans le cas de glucose et de la pente dans le cas du lactose et/ou du saccharose. La production de sulfure d'hydrogène à partir du thiosulfate est mise en évidence par la formation d'une coloration noire et le dégagement de CO₂ est révélé par l'apparition de bulles d'air dans le culot ou le décollement de la gélose (Guiraud, 1998).

3.3.6. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité

La mobilité bactérienne et archéenne ainsi que la fermentation du mannitol sont étudiées en ensemençant le milieu semi-solide mannitol-mobilité par pique 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 pique d'inoculation, l'utilisation du mannitol est traduite par un virage de la couleur du rouge au jaune (Gerhardt *et al.*, 1994).

3.3.7. Production d'indole

Certaines bactéries désaminent puis hydrolysent le tryptophane pour donner une molécule d'indole. L'indole réagit avec la fonction aldéhyde du para-diméthyl-amino-benzaldéhyde pour donner un composé coloré en rouge.

L'ensemencement des souches est réalisé sur un milieu de culture liquide supplémenté de 0,5% (p/v) d'extrait de levure. Après incubation, la production d'indole est mise en évidence par l'ajout de quelques gouttes du réactif de Kovacs. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge à la surface (Gonzalez *et al.*, 1978).

3.3.8. Réactions de Voges Proskauer (VP) et au Rouge de Méthyle (RM)

Ensemencement du milieu de Clark et Lubs et après incubation, la lecture se fait en ajoutant 0,5 ml de KOH à 40% (p/v) (réactif VP1) et 0,5 ml d'alpha-naphtol (v/p) (réactif VP2) pour la

mise en évidence de la présence d'acétoïne. Une réaction positive (VP+) se traduit par une coloration rose.

La production d'acides mixtes est recherchée sur le même milieu. La lecture se fait par addition de quelques gouttes d'une solution au rouge méthyle. Une réaction positive (RM+) se traduit par le virage de la couleur du bouillon au rouge (Harley et Prescott, 2002).

3.3.9. Recherche de l'uréase

L'enzyme hydrolysant l'urée est recherchée sur le milieu synthétique à l'urée de Christensen. Les souches sont ensemencées sur gélose inclinée puis incubées. La réaction positive se traduit par une coloration rouge violacée ou orange foncée par contre une teinte jaune du milieu indique une réaction négative (Guiraud, 1998).

3.4. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

La production d'hydrolases extracellulaires est recherchée qualitativement sur milieu solide modifié par réduction de la quantité d'extrait de levure et de peptone à 0,3 g/l (milieu de base) et par rajout de polymère-test (Oren *et al.*, 1997).

3.4.1. Détermination de l'activité amylolytique

La présence de l'activité amylolytique est déterminée qualitativement selon la méthode décrite par Amoozegar *et al.* (2003), en utilisant le milieu de base additionné de 1% (p/v) d'amidon soluble (Merck). Après incubation, les colonies sont inondées avec une solution de lugol (Annexe 1). L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par apparition d'une zone claire autour de la colonie. À l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun.

3.4.2. Détermination de l'activité protéolytique

➤ Recherche de la gélatinase

L'ensemencement se fait par touche sur milieu de base supplémenté de 1% (p/v) de gélatine. L'hydrolyse est révélée par addition de 1 à 2ml du réactif de Frazier. Une zone claire indique la production d'une gélatinase (Gutiérrez et Gonzalez, 1972).

➤ Recherche de la caséinase

Le milieu de base est supplémenté par 1% (p/v) de caséine. Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont incubées. La présence de cette activité est détectée par un halo clair autour des colonies indiquant une hydrolyse de la caséine (Roxana *et al.*, 2009).

3.4.3. Détermination de l'activité lipolytique

La recherche d'estérase est effectuée par le test d'hydrolyse des Tweens 20 et 80 alors que celle de lipase est effectuée par l'hydrolyse de l'huile d'olive.

Cette activité est recherchée sur milieu de base contenant 1% (v/v) de Tween 80 ou de Tween 20 (Gonzalez *et al.*, 1978), ou encore de 2,5% (v/v) d'huile d'olive (Sigurgísladóttir *et al.*, 1993). L'ensemencement des souches est effectué par touches. Après incubation, le développement d'un précipité autour des touches témoigne la présence d'une lipase.

3.4.4. Détermination de l'activité cellulolytique (CMCase)

La présence d'une cellulase est examinée sur milieu de base contenant 0,5% (p/v) de Carboxy Méthyl Cellulose (CMC). Après incubation, les boîtes sont pulvérisées avec une solution au rouge Congo à 0,1% (p/v) et incubées à 30°C pendant 15 à 30 minutes. Cette solution est remplacée par une solution de NaCl 1M durant 5 à 10 minutes et laissées à température ambiante. L'apparition de zones claires autour des colonies est un résultat positif indiquant la présence de cellulase (Romano Mwirichia *et al.*, 2010).

4. Taxonomie numérique

L'analyse numérique des données est effectuée après codification des résultats des tests: 1 pour «positif ou présent», 0 pour «négatif ou absent». Deux matrices sont construites avec 63 caractères phénotypiques, la première contient 60 souches à Gram positifs dont 9 souches de référence et la deuxième contient 71 souches à Gram négatifs et dont 18 sont des souches de référence (Tableau 2). Pour le calcul des similitudes entre souches, les données sont traitées par le coefficient de corrélation «Simple Matching» de Sokal et Michener (1958). Les regroupements (clustérisation) des isolats par la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) sont effectués par le programme TAXAN (The Numerical Taxonomy Program) Version 2, développé par l'Institut de Biotechnologie de Maryland, aux Etats-Unis. C'est un programme de classification taxonomique basé sur les caractéristiques semblables.

UPGMA utilise un algorithme de clustérisation séquentiel dans lequel les relations sont identifiées dans l'ordre de leur similarité et la reconstruction de l'arbre se fait de manière séquentielle grâce à cet ordre. Il y a d'abord une identification des deux individus «OTU» (Operational Taxonomic Units) les plus proches, et ce groupe est ensuite traité comme un tout, puis il y a une recherche de l'individu le plus proche et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il n'y

ait plus que deux groupes. Cet algorithme permet de calculer un arbre ultra métrique (Luchetta *et al.*, 2005).

La construction graphique des dendrogrammes est effectuée avec le logiciel MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) Version 5.0 de Tamura *et al.* (2011).

Les caractères phénotypiques des souches de référence utilisés lors de l'analyse numérique figurent dans les tableaux 3 et 4 (Annexe 2).

Tableau 2. Souches de référence utilisées pour la taxonomie numérique.

Souche	Gram	Lieu d'isolement	Auteur
<i>Halobacillus humanensis</i> JSM 071077 ^T	+	Saumure souterraine (Province de Hunan, Chine)	Peng <i>et al.</i> , 2009
<i>Gracilibacillus halophilus</i> YIM-C55.5 ^T	+	Sol salin (Bassin de Qaidam, Chine)	Chen <i>et al.</i> , 2008
<i>Thalassobacillus devorans</i> G-19.1 ^T	+	Sol salin (Espagne)	García <i>et al.</i> , 2005
<i>Thalassobacillus cyri</i> HS286 ^T	+	Lac Howz-Soltan (Iran)	Sánchez-Porro <i>et al.</i> , 2009
<i>Virgibacillus chiguensis</i> NTU-101 ^T	+	Saline de Chigu (Taiwan)	Wang <i>et al.</i> , 2008a
<i>Virgibacillus olivae</i> E308 ^T	+	Eau usagée du traitement des olives verts (Espagne)	Quesada <i>et al.</i> , 2007
<i>Salinicoccus halodurans</i> W24 ^T	+	Sol salin (Province de Qinghai, Chine)	Wang <i>et al.</i> , 2008b
<i>Salinicoccus iranensis</i> QW6 ^T	+	Eau usagée d'industrie textile (Qom, Iran)	Amoozegar <i>et al.</i> , 2008
<i>Halococcus morrhuae</i> DSM 1307 ^T	+	Mer morte	Kocur et Hodgkiss, 1973
<i>Halomonas sabkhae</i> 5-3 ^T	-	Sebkha Ezzemoul (Algérie)	Kharroub <i>et al.</i> , 2008a
<i>Salicola salis</i> B2 ^T	-	Sebkha Ezzemoul (Algérie)	Kharroub <i>et al.</i> , 2006a
<i>Salicola marasensis</i> 7Sm5 ^T	-	Etang de cristallisation (Maras, Andes péruviens)	Maturrano <i>et al.</i> , 2006
<i>Marinobacter lacisalsi</i> FP2.5 ^T	-	Lac Fuente de Piedra (Province Malaga, Espagne)	Aguilera <i>et al.</i> , 2009
<i>Marinobacter szutsaonensis</i> NTU-104 ^T	-	Saline de Szutsao (Taiwan)	Wang <i>et al.</i> , 2009
<i>Marinobacterium maritimum</i> AR11 ^T	-	Sédiment marin (Arctique)	Kim <i>et al.</i> , 2009
<i>Chromohalobacter japonicus</i> 43 ^T	-	Aliment salé (Japon)	Sánchez-Porro <i>et al.</i> , 2007
<i>Chromohalobacter salarius</i> CG4.1 ^T	-	Saline Cabo de Gata (Province Almería, Espagne)	Aguilera <i>et al.</i> , 2007

T, type.

Tableau 2. Souches de référence pour la taxonomie numérique

Souche	Gram	Lieu d'isolement	Auteur
<i>Halorubrum kocurii</i> BG-1 ^T	-	Lac salé Bagaejinnor (Mongolie, Chine)	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2008
<i>Halorubrum luteum</i> CGSA15 ^T	-	Lac salé Chagannor (Mongolie, Chine)	Hu <i>et al.</i> , 2008
<i>Halorubrum ezzemoulense</i> 5.1 ^T	-	Sebkha Ezzemoul (Algérie)	Kharroub <i>et al.</i> , 2006b
<i>Halorubrum saccharovororum</i> NCIMB 2081 ^T	-	Salines autour de Bhavnagar (Inde)	Tomlinson et Hochstein, 1977; McGenity et Grant, 1995
<i>Halomicrobium katesii</i> AI-5 ^T	-	Lac Tebenquiche (saline d'Atacama, Chili)	Kharroub <i>et al.</i> , 2008b
<i>Halobacterium jilantaiense</i> NG4 ^T	-	Lac salé Jilantai (Mongolie, Chine)	Yang <i>et al.</i> , 2006
<i>Halobacterium piscisalsi</i> HPC1-2 ^T	-	Poisson fermenté (pla-ra) (Thaïlande)	Yachai <i>et al.</i> , 2008
<i>Haloferax elongans</i> SA5 ^T	-	Mattes microbiennes (Australie)	Allen <i>et al.</i> , 2008
<i>Haloterrigena hispanica</i> FP1 ^T	-	Lac salé Fuente de Piedra (Espagne)	Romano <i>et al.</i> , 2007
<i>Haloarcula amylolytica</i> BD-3 ^T	-	Lac salé Aibi (Xin-Jiang, Chine)	Yang <i>et al.</i> , 2007

T, type.

Résultats et discussion

1. Caractérisation physico-chimique des échantillons

D'après les résultats de l'analyse physico-chimique des échantillons présentés dans le tableau 5, la salinité totale enregistrée pour l'eau de la sebkha Ezzemoul est plus élevée à celle enregistrée au niveau du site de Chott de Oued Righ.

La sebkha Ezzemoul et le Chott Melghir ont révélé un pH neutre à légèrement alcalin (pH de 7,10 à 7,50) qui est proche de celui du Grand Lac Salé (USA) (Gerday et Glansdorff, 2007). Tandis que le pH des deux autres sites tend plutôt vers l'alcalinité (pH 7,80 à 9,35). Des valeurs proches ont été notées pour le Lac Nakuru (Gerday et Glansdorff, 2007) et également proches de celles du lac salé d'El Goléa (Boutaiba *et al.*, 2011).

Le pH légèrement alcalin des sédiments (pH 7,8 à 8,8), est dû probablement à la présence du gypse. L'action conjuguée d'un climat caractérisé par une évaporation intense et la présence d'une nappe peu profonde fait que la plupart des sols ont subi le phénomène de salinisation secondaire. Le type de salure est sulfaté calcique ou magnésique jusqu'à 3 degrés de salinité en moyenne et chloruré sodique au-delà (Hattal, 2001).

Tableau 5. Valeurs de la salinité et de pH des échantillons.

Sites	Ezzemoul		Chott Melghir	Oued Righ		Sidi Mahdi
	Eau	Sel	Sel	Eau	Sédiment	Sédiment
Salinité % (p/v)	30	nd	nd	5	nd	nd
pH	7,53	7,50	7,10	9,35	8,80	7,80

nd, non déterminé.

2. Caractérisation phénétique des isolats

Le criblage des microorganismes halophiles à partir des échantillons d'eau, de sel et/ou de sédiments des quatre sites étudiés a mené à l'isolement de 104 isolats: 70 de la sebkha Ezzemoul, 7 de Chott Melghir, 8 de Oued Righ et 19 de Sidi Mahdi. Comme indiqué dans le tableau 6, ils sont désignés selon un code composé de deux lettres et d'un numéro.

La caractérisation phénétique des isolats est réalisée après avoir déterminé les conditions optimales de croissance (salinité, température et pH).

Tableau 6. Répartition des souches pures selon leur provenance (échantillon et site).

Sites de prélèvement	Sebkha Ezzemoul		Chott Melghir	Oued Righ		Sidi Mahdi	
Echantillon	Eau	Sel	Sel	Eau (OR)	Sédiment (RS)	Sebkha (MS)	Source chaude (MC)
Souches	Ez1, Ez4, Ez5, Ez6, Ez7, Ez8, Ez9, Ez10, Ez11, Ez12, Ez19, Ez21, Ez22, Ez23, Ez24, Ez24, Ez25, Ez26, Ez27, Ez28, Ez29, Ez30, Ez31, Ez33, Ez34, Ez35, Ez38, Ez39, Ez40, Ez41, Ez42, Ez43, Ez44, Ez45, Ez46, Ez51, Ez52, Ez53, Ez54, Ez55, Ez56, Ez57, Ez58, Ez59, Ez60, Ez61, Ez62, Ez63, Ez64, Ez65	Ez2, Ez3, Ez13, Ez14, Ez15, Ez16, Ez17, Ez18, Ez20, Ez36, Ez37, Ez47, Ez48, Ez49, Ez50, Ez66, Ez67, Ez68, Ez69, Ez70	Mg1, Mg2, Mg3, Mg4, Mg5, Mg6, Mg7	OR1, OR2	RS3, RS4, RS5, RS6, RS7, RS8	MS1, MS2, MS3, MS4, MS5, MS6, MS7, MS8, MS9, MS10	MC11, MC12, MC13, MC14, MC15, MC16, MC17, MC18, MC19
Total des souches	50	20	07	02	06	10	09

Ez, Ezzemoul; Mg, Melghir; OR, Eau de Oued Righ; RS, Sédiments de Oued Righ; MS, Sebkha de Sidi Mahdi; MC, Source chaude de Sidi Mahdi.

2.1. Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies

La caractérisation macroscopique et microscopique des souches figure dans le tableau 7. La plupart des souches forment sur milieux solides des colonies crèmes à surface lisse, plates, circulaires, à bords réguliers et dont le diamètre varie de 1 à 2 mm (Figure 5). Un second aspect macroscopique est observé avec 28 isolats qui ont formé après 21 jours d'incubation à 37°C, des colonies circulaires, convexes, bombées et d'un diamètre d'environ 1mm. Elles sont toutes pigmentées en orange, en rouge ou en rose. Ce type de pigmentation est un trait caractéristique des archaea halophiles extrêmes dû à un pigment de type caroténoïde (Grant *et al.*, 2001; Oren et Rodriguez-Valera, 2001).

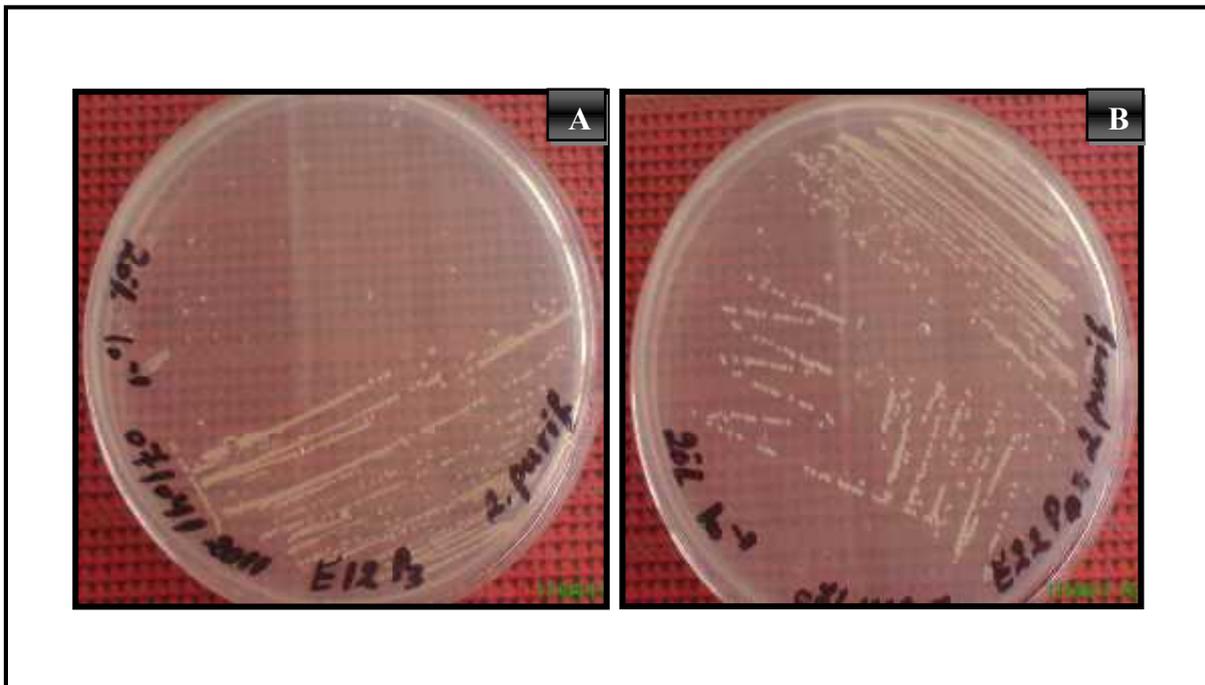


Figure 5. Exemples d'aspects macroscopiques des isolats cultivés sur le milieu HM. **A**, Souche Ez39 et **B**, Souche Ez46. Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Ericsson Cyber-shot DSC (zoom x 2).

La coloration de Gram effectuée selon la technique de Dussault (1955) a révélé une dominance de courts bâtonnets à Gram positifs, à extrémités arrondies et souvent disposés en paires ou en chaînettes (Figure 6). Quant aux formes coccoïdale et coccobacillaire sont observées chez 18 et 6 souches, respectivement.

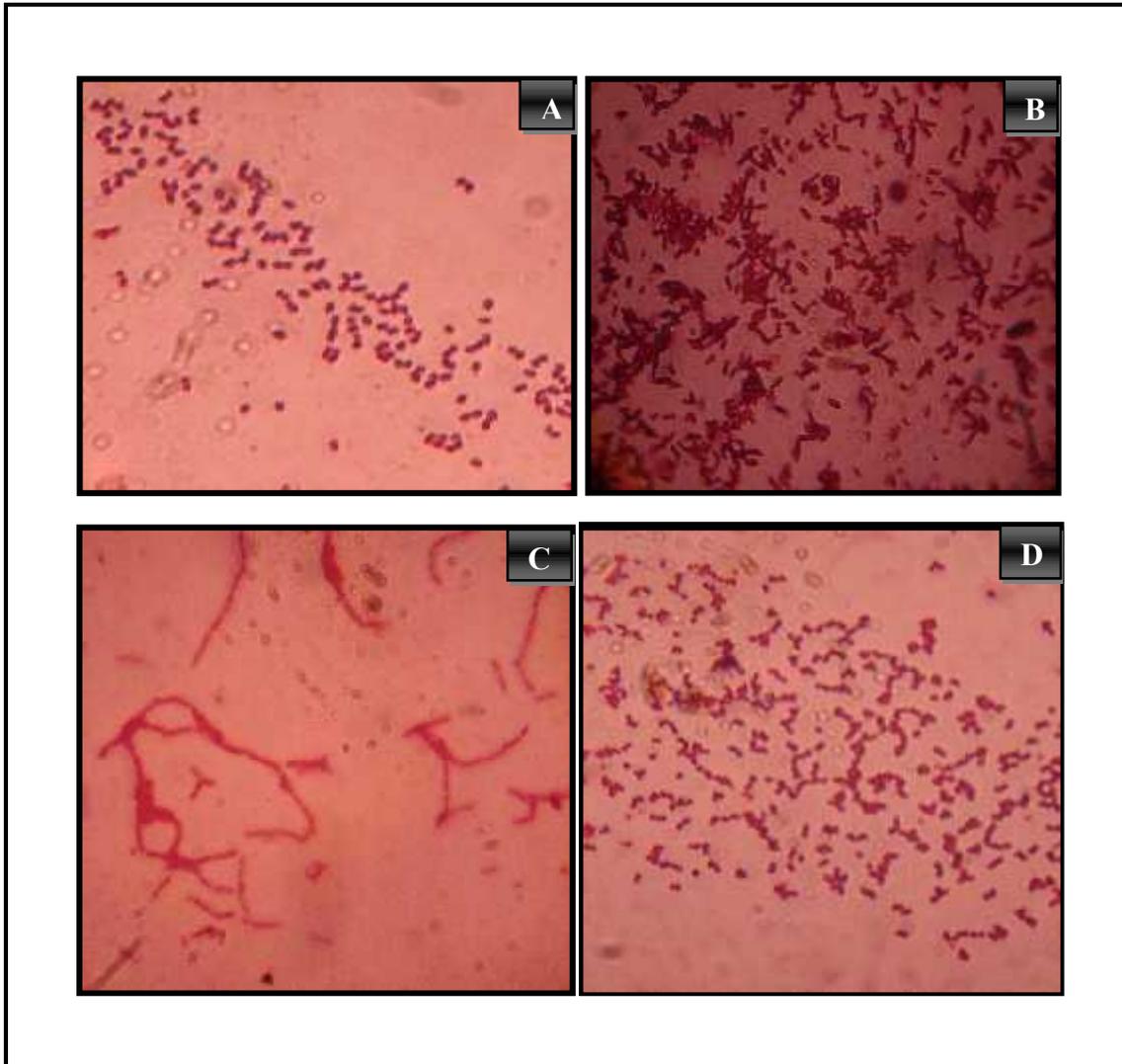


Figure 6. Exemples d'observations microscopiques de la coloration de Gram à l'immersion (x100). **A**, Souche Ez2. **B**, Souche Ez14. **C**, Souche OR1 et **D**, Souche MS10. Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Cyber shot DSC-W530 (zoom x4).

Tableau 7. Caractérisation morphologique des isolats.

Souches	Pigmentation	Morphologie des colonies	Gram	Morphologie cellulaire
Ez1	Orange	En fusceau plate	-	Cocci
Ez2	Crème	Circulaire plate	+	Coccobacilles
Ez3	Crème	Circulaire convexe	+	Courts bâtonnets
Ez4	Crème	Circulaire convexe	-	Courts bâtonnets fins
Ez5	Crème à centre foncé	Légèrement en fusceau et légèrement élevée	-	Courts bâtonnets
Ez6	Crème	Circulaire plate	-	Bâtonnets
Ez7	Crème	Circulaire plate	+	Cocci
Ez8	Crème	Punctiforme plate	+	Courts bâtonnets
Ez9	Crème	Circulaire convexe	+	Courts bâtonnets
Ez10	Crème	Circulaire convexe	+	Courts bâtonnets
Ez11	Crème	Circulaire plate	+	Courts bâtonnets
Ez12	Crème	Circulaire convexe	-	Courts bâtonnets
Ez13	Crème	Circulaire plate	+	Cocci
Ez14	Crème	Circulaire plate	+	Courts bâtonnets
Ez15	Crème	Circulaire plate	-	Cocci
Ez16	Crème	Circulaire plate	-	Courts bâtonnets
Ez17	Marron claire	Circulaire plate	+	Courts bâtonnets
Ez18	Crème	Circulaire plate	+	Bâtonnets
Ez19	Crème	Circulaire plate	-	Cocci
Ez20	Crème	Circulaire plate	+	Cocci
Ez21	Jaune	Circulaire légèrement convexe	+	Coccobacilles
Ez22	Crème	Circulaire convexe	+	Bâtonnets
Ez23	Crème	Circulaire convexe	+	Courts bâtonnets
Ez24	Crème	Circulaire plate	-	Courts bâtonnets
Ez25	Crème	Circulaire convexe	-	Courts bâtonnets
Ez26	Beige	Circulaire convexe	-	Bâtonnets
Ez27	Crème	Circulaire convexe	+	Courts bâtonnets

Tableau 7. Caractérisation morphologique des isolats (suite).

Souches	Pigmentation	Morphologie des colonies	Gram	Morphologie cellulaire
Ez28	Crème	Circulaire plate	+	Courts bâtonnets
Ez29	Crème	Circulaire élevée	-	Cocci
Ez30	Crème	Circulaire plate	-	Courts bâtonnets
Ez31	Beige	Circulaire plate	-	Bâtonnets
Ez32	Crème	Circulaire plate	+	Bâtonnets
Ez33	Crème	Circulaire plate	+	Cocci
Ez34	Crème	Circulaire convexe	-	Courts bâtonnets
Ez35	Crème	Circulaire plate	+	Courts bâtonnets
Ez36	Crème	Circulaire plate	-	Courts bâtonnets fins
Ez37	Crème	Circulaire plate	-	Cocci
Ez38	Transparente	Circulaire plate	+	Fins bâtonnets
Ez39	Crème	Circulaire plate	+	Courts bâtonnets
Ez40	Crème	Circulaire plate	+	Bâtonnets
Ez41	Crème	Circulaire plate	-	Courts bâtonnets
Ez42	Crème	Circulaire convexe	+	Courts bâtonnets
Ez43	Crème	Circulaire plate	+	Bâtonnets
Ez44	Crème	Circulaire plate	+	Coccobacilles
Ez45	Orange	Circulaire plate	+	Courts bâtonnets
Ez46	Crème	Circulaire plate	-	Courts bâtonnets
Ez47	Crème	Circulaire convexe	-	Courts bâtonnets
Ez48	Orange	Circulaire convexe	-	Courts bâtonnets fins
Ez49	Orange	Circulaire convexe	-	Courts bâtonnets fins
Ez50	Orange	Circulaire convexe	+	Fins bâtonnets
Ez51	Orange	Circulaire convexe	+	Courts bâtonnets gonflés
Ez52	Orange	Circulaire convexe	-	Courts bâtonnets fins
Ez53	Rouge	Circulaire convexe	+	Courts bâtonnets
Ez54	Orange	Circulaire convexe	+	Fins bâtonnets
Ez55	Orange	Circulaire convexe	-	Courts bâtonnets très fins

Tableau 7. Caractérisation morphologique des isolats (suite).

Souches	Pigmentation	Morphologie des colonies	Gram	Morphologie cellulaire
Ez56	Rose claire	Circulaire convexe	+	Bâtonnets très fins
Ez57	Orange	Circulaire convexe	+	Courts bâtonnets
Ez58	Orange	Circulaire convexe	+	Courts bâtonnets fins
Ez59	Rouge	Circulaire convexe	-	Coccobacilles
Ez60	Orange	Circulaire convexe	-	Courts bâtonnets
Ez61	Orange	Circulaire convexe	-	Courts bâtonnets
Ez62	Orange	Circulaire convexe	-	Courts bâtonnets
Ez63	Orange	Circulaire convexe	+	Courts bâtonnets
Ez64	Orange	Circulaire convexe	+	Courts bâtonnets
Ez65	Orange	Circulaire convexe	-	Fins bâtonnets
Ez66	Rouge	Circulaire légèrement convexe	-	Bâtonnets
Ez67	Orange	Circulaire plate	-	Bâtonnets
Ez68	Orange	Circulaire plate	-	Bâtonnets
Ez69	Rouge foncée	Circulaire légèrement convexe	-	Courts bâtonnets
Ez70	Orange	Circulaire plate	-	Bâtonnets
Mg1	Crème	Circulaire plate	+	Cocci
Mg2	Crème	Circulaire plate	-	Cocci
Mg3	Rouge	Circulaire convexe	-	Bâtonnets
Mg4	Orange	Circulaire plate	-	Bâtonnets
Mg5	Rouge	Circulaire plate	-	Cocci
Mg6	Orange	Circulaire convexe	-	Courts bâtonnets
Mg7	Orange	Circulaire plate	-	Court bâtonnets
OR1	Marron claire	Ovale élevée	-	Bâtonnets
OR2	Jaune claire	Circulaire convexe	+	Cocci
RS3	Orange	En fusceau élevée	-	Bâtonnets très fins
RS4	Jaune claire	Circulaire plate	-	Coccobacilles
RS5	Blanchâtre	Circulaire plate	+	Bâtonnets

Tableau 7. Caractérisation morphologique des isolats (suite).

Souches	Pigmentation	Morphologie des colonies	Gram	Morphologie cellulaire
RS6	Orange claire	Circulaire convexe	+	Bâtonnets très fins
RS7	Blanchâtre	Circulaire plate	-	Bâtonnets très courts
RS8	Orange claire	Ovale convexe	+	Cocci
MS1	Blanchâtre	Circulaire plate	-	Cocci
MS2	Jaune	Circulaire convexe	-	Courts bâtonnets fins
MS3	Blanchâtre	Circulaire plate	+	Courts bâtonnets fins
MS4	Blanchâtre	En fusceau plate	+	Cocci
MS5	Blanchâtre	Circulaire plate	-	Bâtonnets très fins
MS6	Blanchâtre	Circulaire plate	+	Coccobacilles
MS7	Jaune claire	Circulaire plate	-	Bâtonnets très fins
MS8	Crème	Circulaire convexe	-	Bâtonnets
MS9	Crème	Circulaire plate	+	Bâtonnets courts
MS10	Crème	Circulaire plate	+	Bâtonnets courts
MC11	Orange claire	Circulaire convexe	-	Cocci
MC12	Blanchâtre	Circulaire plate	+	Courts bâtonnets fins
MC13	Blanchâtre	Ovale plate	+	Longs Bâtonnets
MC14	Jaune orangée	Circulaire élevée	+	Bâtonnets
MC15	Jaune claire	Circulaire élevée	+	Bâtonnets très courts
MC16	Blanchâtre	Circulaire plate	-	Bâtonnets
MC17	Jaune claire	En fusceau convexe	-	Courts bâtonnets fins
MC18	Orange	En fusceau élevée	+	Cocci
MC19	Orange	Circulaire plate	-	Courts bâtonnets fins

2.2. Caractérisation physiologique des isolats

Les résultats de la caractérisation physiologique des isolats sont rassemblés dans les tableaux 8 et 9.

2.2.1. Salinité

La croissance sur milieu de culture dépourvu de sel est observée avec 33 souches et qui peuvent être qualifiées selon Kushner (1978) d'halotolérantes. 28 souches pigmentées sont capables de croître sur des milieux de cultures dont la concentration saline finale peut atteindre 30% (p/v) (5,2M), avec un optimum de croissance de 20 ou 25 % (p/v) (3,4 ou 4,3 M) selon les souches. Mais aucune croissance n'a été observée au dessous de 15 % (p/v) (1,7 M) pour ces mêmes isolats. Ce comportement est similaire à celui des archaea halophiles extrêmes. Le reste des isolats, présentent des optima de croissance se variant entre 7,5 et 20% (p/v), qualifiés respectivement, d'halophiles modérés et extrêmes (Ventosa *et al.*, 1998). Le spectre salin le plus étroit est obtenu avec la souche MS6 isolée des sédiments de Sidi Mahdi (Tableau 8).

2.2.2. Température

La gamme de température explorée varie de 30 à 60°C. 52 isolats tolèrent des variations de températures de 30 à 50°C et quatre d'entre elles (Ez22, Ez42, MC15, MC19) sont aussi capables de croître à 55°C (Tableau 8). Ceci peut s'expliquer par la localisation en régions arides et semi-arides des environnements étudiés. La température optimale de croissance de l'ensemble des souches est située dans la gamme 37-40°C. Il s'agit donc de souches mésophiles à légèrement thermotolérantes (Mégraud, 2011).

2.2.3. pH

L'intervalle de pH permettant la croissance de l'ensemble des souches se situe entre 6,0 et 9,0. Cependant trois isolats d'Ezzemoul (Ez16, Ez17 et Ez24) sont capables de croître à pH 5 et possédant ainsi un intervalle de pH plus considérable de 5,0 à 10,0. Ce sont des acido-alcali-tolérantes. À l'opposé, celui des isolats de l'eau de Oued Righ est étroit (pH 7,0 à pH 8,0). L'optimum de croissance de l'ensemble des souches varie de 7,0 à 7,5, ce sont des souches neutrophiles.

Tableau 8. Salinité, température et pH.

Souches	Salinité (%) (p/v)		pH	Température (°C)
	Gamme	Optimum	Intervalle	Gamme
Ez1	0,0-15,0	7,5	6,0-9,0	30,0-40,0
Ez2	5,0-15,0	10,0	6,0-9,0	30,0-45,0
Ez3	5,0-15,0	7,5	6,0-9,0	30,0-40,0
Ez4	0,0-15,0	7,5	6,0-9,0	30,0-45,0
Ez5	0,0-15,0	7,5	6,0-9,0	30,0-45,0
Ez6	0,0-15,0	0,0	6,0-9,0	30,0-45,0
Ez7	5,0-15,0	7,5	6,0-9,0	30,0-45,0
Ez8	0,0-15,0	0,0	6,0-9,0	30,0-50,0
Ez9	5,0-15,0	7,5	6,0-9,0	30,0-40,0
Ez10	0,0-15,0	0,0	6,0-9,0	30,0-45,0
Ez11	7,5-15,0	10,0	6,0-9,0	30,0-45,0
Ez12	5,0-15,0	7,5	6,0-9,0	30,0-40,0
Ez13	0,0-15,0	0,0	6,0-9,0	30,0-45,0
Ez14	5,0-15,0	7,5	6,0-10,0	30,0-45,0
Ez15	5,0-15,0	7,5	6,0-10,0	30,0-45,0
Ez16	5,0-15,0	10,0	5,0-10,0	30,0-45,0
Ez17	5,0-15,0	10,0	5,0-10,0	30,0-50,0
Ez18	0,0-15,0	0,0	6,0-10,0	30,0-40,0
Ez19	0,0-15,0	7,5	6,0-9,0	30,0-50,0
Ez20	0,0-15,0	7,5	6,0-9,0	30,0-45,0
Ez21	0,0-10,0	0,0	6,0-9,0	30,0-40,0
Ez22	5,0-15,0	10,0	6,0-10,0	30,0-55,0
Ez23	5,0-15,0	10,0	6,0-10,0	30,0-45,0
Ez24	0,0-15,0	7,5	5,0-10,0	30,0-45,0
Ez25	5,0-15,0	10,0	6,0-10,0	30,0-40,0
Ez26	0,0-15,0	7,5	6,0-9,0	30,0-45,0
Ez27	0,0-15,0	0,0	6,0-9,0	30,0-45,0

Tableau 8. Salinité, température et pH (suite).

Souches	Salinité (%) (p/v)		pH	Température (°C)
	Gamme	Optimum	Intervalle	Gamme
Ez28	0,0-15,0	0,0	6,0-9,0	30,0-45,0
Ez29	7,5-15,0	10,0	6,0-10,0	30,0-45,0
Ez30	5,0-15,0	10,0	6,0-10,0	30,0-45,0
Ez31	0,0-15,0	0,0	6,0-9,0	30,0-45,0
Ez32	0,0-15,0	0,0	6,0-9,0	30,0-40,0
Ez33	5,0-15,0	10,0	6,0-10,0	30,0-45,0
Ez34	10,0-25,0	15,0	6,5-8,5	30,0-50,0
Ez35	15,0-25,0	20,0	6,5-8,5	30,0-50,0
Ez36	15,0-30,0	20,0	6,0-8,5	30,0-50,0
Ez37	15,0-30,0	20,0	6,0-8,0	30,0-50,0
Ez38	20,0-25,0	20,0	7,0-8,0	30,0-50,0
Ez39	20,0-25,0	20,0	6,5-8,0	30,0-50,0
Ez40	15,0-25,0	20,0	7,0-8,5	30,0-50,0
Ez41	20,0-25,0	20,0	7,0-8,5	30,0-50,0
Ez42	15,0-30,0	20,0	7,0-8,5	30,0-55,0
Ez43	15,0-30,0	20,0	7,0-8,5	30,0-50,0
Ez44	15,0-30,0	20,0	6,5-8,5	30,0-50,0
Ez45	15,0-30,0	20,0	6,5-8,5	30,0-50,0
Ez46	20,0-25,0	20,0	7,0-8,5	30,0-50,0
Ez47	15,0-30,0	20,0	7,0-8,5	30,0-45,0
Ez48	20,0-30,0	25,0	6,0-8,0	30,0-50,0
Ez49	20,0-30,0	25,0	6,0-8,0	30,0-50,0
Ez50	20,0-30,0	25,0	6,0-8,5	30,0-50,0
Ez51	20,0-30,0	25,0	6,5-8,5	30,0-50,0
Ez52	20,0-30,0	25,0	6,0-8,5	30,0-50,0
Ez53	15,0-30,0	20,0	6,0-8,5	30,0-50,0
Ez54	15,0-30,0	20,0	6,0-8,5	30,0-50,0

Tableau 8. Salinité, température et pH (suite).

Souches	Salinité (%) (p/v)		pH	Température (°C)
	Gamme	Optimum	Intervalle	Gamme
Ez55	20,0-30,0	25,0	7,0-8,5	30,0-50,0
Ez56	17,5-25,0	20,0	7,0-8,5	30,0-50,0
Ez57	20,0-30,0	25,0	6,5-8,5	30,0-50,0
Ez58	15,0-30,0	25,0	6,0-9,0	30,0-50,0
Ez59	15,0-30,0	25,0	6,0-8,0	30,0-50,0
Ez60	15,0-30,0	25,0	7,0-8,5	30,0-50,0
Ez61	15,0-30,0	25,0	7,0-8,5	30,0-50,0
Ez62	20,0-30,0	25,0	6,5-8,0	30,0-50,0
Ez63	15,0-30,0	25,0	6,0-8,0	30,0-50,0
Ez64	15,0-30,0	25,0	6,5-8,0	30,0-50,0
Ez65	15,0-30,0	25,0	6,0-8,0	30,0-50,0
Ez66	15,0-30,0	25,0	6,0-8,0	30,0-50,0
Ez67	15,0-30,0	25,0	6,0-8,5	30,0-50,0
Ez68	15,0-30,0	25,0	6,0-8,5	30,0-50,0
Ez69	15,0-30,0	25,0	6,0-8,5	30,0-50,0
Ez70	15,0-30,0	25,0	6,0-8,5	30,0-50,0
Mg1	5,0-15,0	7,5	6,0-9,0	30,0-40,0
Mg2	5,0-15,0	10,0	6,0-10,0	30,0-50,0
Mg3	15,0-30,0	25,0	7,0-8,5	30,0-50,0
Mg4	15,0-30,0	25,0	7,0-8,5	30,0-50,0
Mg5	25,0-30,0	25,0	7,0-8,5	30,0-50,0
Mg6	20,0-30,0	25,0	7,0-8,5	30,0-50,0
Mg7	15,0-30,0	25,0	7,0-8,5	30,0-50,0
OR1	5,0-15,0	10,0	7,0-8,0	30,0-45,0
OR2	3,0-12,5	7,5	7,0-8,0	30,0-45,0
RS3	0,0-3,0	0,0	6,0-8,5	30,0-45,0
RS4	0,0-10,0	0,0	6,5-8,5	30,0-45,0

Tableau 8. Salinité, température et pH (suite).

Souches	Salinité (%) (p/v)		pH	Température (°C)
	Gamme	Optimum	Intervalle	Gamme
RS5	0,0-10,0	0,0	6,0-9,0	30,0-45,0
RS6	0,0-10,0	0,0	6,0-9,0	30,0-45,0
RS7	0,0-10,0	5,0	6,0-9,0	30,0-45,0
RS8	0,0-12,5	10,0	6,5-8,5	30,0-45,0
MS1	5,0-25,0	10,0	6,0-9,0	30,0-50,0
MS2	5,0-15,0	10,0	6,0-9,0	30,0-45,0
MS3	5,0-12,5	10,0	6,0-9,0	30,0-45,0
MS4	0,0-10,0	0,0	6,0-9,0	30,0-45,0
MS5	5,0-20,0	10,0	6,0-9,0	30,0-45,0
MS6	3,0-5,0	3,0	6,5-8,5	30,0-45,0
MS7	0,0-12,5	10,0	6,5-8,5	30,0-45,0
MS8	0,0-10,0	7,5	6,0-9,0	30,0-45,0
MS9	5,0-25,0	15,0	7,0-9,0	30,0-45,0
MS10	5,0-25,0	15,0	6,0-8,5	30,0-45,0
MC11	0,0-12,5	10,0	6,5-9,0	30,0-50,0
MC12	0,0-12,5	0,0	6,0-9,0	30,0-50,0
MC13	0,0-12,5	0,0	6,5-8,5	30,0-50,0
MC14	0,0-7,5	0,0	6,0-8,5	30,0-50,0
MC15	0,0-12,5	0,0	6,0-8,5	30,0-55,0
MC16	0,0-15,0	0,0	6,0-8,5	30,0-50,0
MC17	5,0-12,5	10,0	6,0-9,0	30,0-50,0
MC18	0,0-12,5	0,0	6,0-9,0	30,0-50,0
MC19	5,0-20,0	15,0	6,0-10,0	30,0-55,0

2.2.4. Utilisation des substrats carbonés par les isolats

Les monosaccharides ainsi que les disaccharides sont les sources carbonées les plus assimilées par les isolats en comparaison avec les autres substrats-tests. Cependant, cette assimilation reste faible par rapport à d'autres microorganismes. Quant aux alcools (glycérol

et mannitol), ils sont modérément utilisés par l'ensemble des isolats. Le lactate est le seul acide organique utilisé, principalement, par les isolats d'Ezzemoul et de Sidi Mahdi. La glycine est le seul acide aminé testé, elle est largement assimilée par les isolats de Oued Righ et de Sidi Mahdi (Tableau 9).

Tableau 9. Utilisation des substrats carbonés par les isolats.

Souches	Glucose	Galactose	Fructose	Saccharose	Lactose	Maltose	Mélibiose	Mannitol	Glycérol	Lactate	Acétate	Oxalate	Glycine
Ez1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Ez2	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
Ez3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Ez4	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Ez5	-	-	-	+	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	+
Ez6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez7	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez9	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
Ez10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez11	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Ez12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez13	+	+	+	-	+	+ _f	+	+	-	-	-	-	-
Ez14	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
Ez15	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Ez16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Ez17	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
Ez18	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Ez19	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ez20	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+

+, croissance; -, absence de croissance; f, croissance faible.

Tableau 9. Utilisation des substrats carbonés par les isolats (suite).

Souches	Glucose	Galactose	Fructose	Saccharose	Lactose	Maltose	Mélibiose	Mannitol	Glycérol	Lactate	Acétate	Oxalate	Glycine
Ez21	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
Ez22	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
Ez23	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
Ez24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Ez25	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Ez26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez29	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Ez30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Ez31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez33	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+ _f	-	-	-
Ez34	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez36	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Ez37	+	+	+	+	-	+	-	+	+ _f	-	-	-	-
Ez38	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ez39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez40	-	+ _f	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ez41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez42	+	+	-	+	+ _f	-	-	+	-	-	-	-	-
Ez43	-	-	-	+	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-
Ez44	-	-	-	+	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-
Ez45	+ _f	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-

+ , croissance; - , absence de croissance; f, croissance faible.

Tableau 9. Utilisation des substrats carbonés par les isolats (suite).

Souches	Glucose	Galactose	Fructose	Saccharose	Lactose	Maltose	Mélibiose	Mannitol	Glycérol	Lactate	Acétate	Oxalate	Glycine
Ez46	-	+ _f	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ez47	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ez48	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Ez49	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Ez50	+	+	+	+	-	+ _f	+	+ _f	+	-	-	-	-
Ez51	-	-	+	+	-	+ _f	-	-	+	+ _f	-	-	-
Ez52	+ _f	-	+ _f	+ _f	-	-	+	+ _f	+	-	-	+ _f	-
Ez53	+ _f	-	+ _f	+	-	+ _f	-	-	-	+	+ _f	-	-
Ez54	-	-	+ _f	+	-	+ _f	-	-	+	+ _f	-	-	-
Ez55	+	+	+ _f	+	-	+ _f	+	-	+	+ _f	-	-	-
Ez56	-	+ _f	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ez57	+	+	+	+	-	+ _f	-	-	-	+ _f	-	-	-
Ez58	+	-	+ _f	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Ez59	-	+	+	+	-	-	-	+ _f	+	+ _f	-	-	-
Ez60	+	-	+ _f	+	-	-	-	+ _f	+	+ _f	-	-	-
Ez61	+	-	+ _f	+	-	+	-	+ _f	+	+ _f	-	-	-
Ez62	-	-	+	+	+ _f	+	-	+	+ _f	-	-	-	-
Ez63	-	-	+ _f	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Ez64	-	-	+	+	+ _f	+	-	+	+	-	-	-	-
Ez65	-	-	+ _f	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Ez66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez67	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez70	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, croissance; -, absence de croissance; f, croissance faible.

Tableau 9. Utilisation des substrats carbonés par les isolats (suite).

Souches	Glucose	Galactose	Fructose	Saccharose	Lactose	Maltose	Mélibiose	Mannitol	Glycérol	Lactate	Acétate	Oxalate	Glycine
Mg1	-	+	+	-	-	+ _f	+	+	-	-	-	-	-
Mg2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Mg3	-	+ _f	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mg4	-	+ _f	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-
Mg5	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mg6	-	+ _f	-	+ _f	+ _f	-	-	-	+ _f	-	-	-	-
Mg7	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OR1	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
OR2	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
RS3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
RS4	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
RS5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
RS6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
RS7	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
RS8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS1	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
MS2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
MS3	+	-	+	+ _f	+	+	+ _f	+	-	+	-	-	-
MS4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MS5	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
MS6	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
MS7	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
MS8	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
MS9	+	+ _f	+	-	+	+ _f	+ _f	+	-	+	-	-	+
MS10	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+

+, croissance; -, absence de croissance; f, croissance faible.

Tableau 9. Utilisation des substrats carbonés par les isolats (suite).

Souches	Glucose	Galactose	Fructose	Saccharose	Lactose	Maltose	Mélibiose	Mannitol	Glycérol	Lactate	Acétate	Oxalate	Glycine
MS10	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
MC11	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
MC13	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
MC14	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
MC15	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
MC16	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MC17	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
MC18	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
MC19	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+

+, croissance; -, absence de croissance; f, croissance faible.

2.3. Caractérisation biochimique des isolats

Les résultats de la caractérisation biochimique sont résumés dans le tableau 10.

2.3.1. Mise en évidence des enzymes respiratoires

La plupart des souches étudiées sont catalase et cytochrome oxydase positives. Elles sont donc aérobies ou anaérobies facultatives. L'absence de la cytochrome oxydase est surtout observée chez les isolats de la sebkhia Ezzemoul et de la catalase chez ceux des sédiments de Sidi Mahdi.

2.3.2. Utilisation de citrate sur le milieu au citrate de Simmons

La capacité de croître sur le citrate comme unique source de carbone et d'énergie est observée avec 2 souches uniquement (OR1 et OR2) isolées de l'eau de Oued Righ.

2.3.3. Recherche de la β -galactosidase

Sur les 28 souches testées pour la production de la β -galactosidase, enzyme responsable de la dégradation du lactose, 9 se sont révélées positives pour ce test. Parmi lesquelles, un seul

isolat est trouvé incapable de croître sur le lactose (Tableau 10). La seule explication à ceci, est que cette souche est probablement déficiente en la β -galactoside perméase responsable du transport du lactose dans le cytoplasme, comme il a été suggéré par certains auteurs (Joffin et Leyral, 2006).

2.3.4. Recherche de la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et l'arginine dihydrolase

La plupart des souches ne produisent pas ces enzymes. Cependant, 15 souches possèdent les trois types d'enzymes et dont 12 proviennent de la sebkha Ezzemoul.

2.3.5. Croissance sur le milieu Triple Sugar Iron (TSI)

Les résultats de la croissance sur le milieu TSI, ont montré que l'oxydation du lactose et/ou du saccharose est plus fréquente que la fermentation du glucose et l'absence de production de H_2S et de CO_2 .

2.3.6. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité

La majorité des isolats sont immobiles et fermentent faiblement le mannitol selon les résultats du test mannitol-mobilité.

2.3.7. Production d'indole

Une seule souche halophile extrême Ez44 isolée de la sebkha Ezzemoul possède une tryptophanase responsable de la production d'indole.

2.3.8. Réactions de Voges Proskauer (VP) et au Rouge de Méthyle (RM)

La production d'acides mixtes mise en évidence par la solution au rouge de méthyle et celle d'acétoïne révélée par les réactifs VP1 et VP2, sont généralement faibles. Cependant, 7 souches ont la capacité d'exécuter les deux types de fermentations.

2.3.9. Recherche de l'uréase

L'uréase est détectée chez 31 souches dont 24 sont isolées de la sebkha Ezzemoul et parmi elles, 17 sont des halophiles extrêmes.

2.3.10. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

La production d'activités hydrolytiques (amylolytique, protéolytique, lipolytique et cellulolytique) a été observée chez 72 souches étudiées (tableau 10). Un exemple d'hydrolyse est représenté par la figure 7. L'hydrolyse de l'amidon est effectuée par plus de souches que celles des autres polymères, observation faite pour les isolats des quatre sites étudiés (Figure 8). Cette hydrolyse est observée spécialement avec les souches halophiles modérées.

L'activité protéolytique est présente chez les isolats d'Ezzemoul et de Sidi Mahdi avec une préférence notable pour la dégradation de la gélatine. Ces mêmes isolats sont dotés d'une activité cellulolytique, relativement élevée pour ceux de Sidi Mahdi.

L'hydrolyse des Tweens 20 et 80 est très faible. Elle est observée uniquement pour quelques isolats d'Ezzemoul. En revanche, aucune souche n'est trouvée capable d'hydrolyser l'huile d'olive.

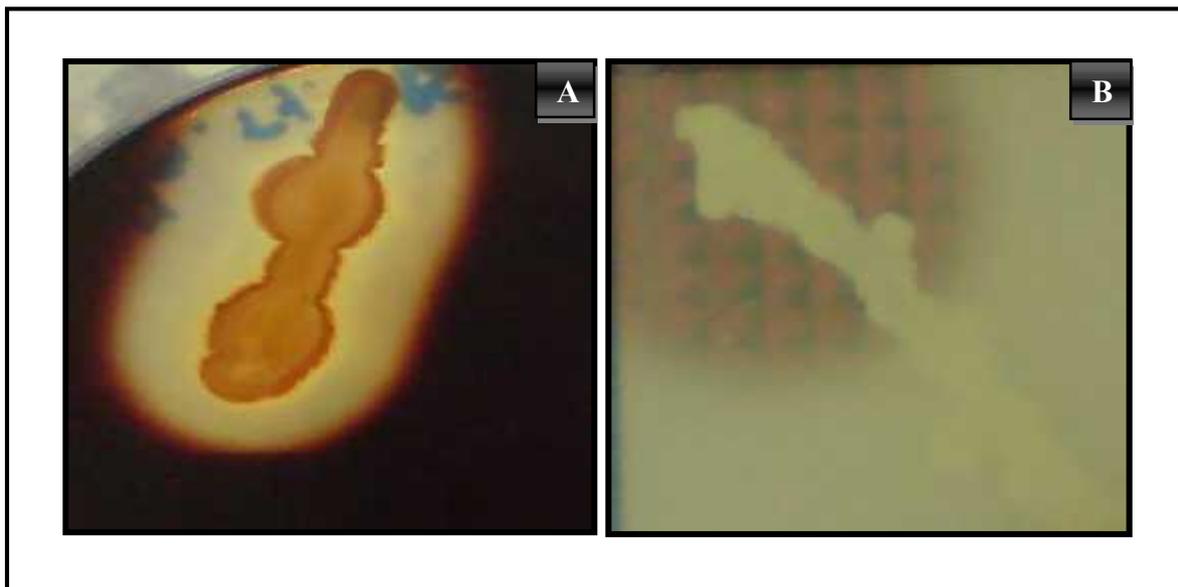


Figure 7. Exemples de mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires. **A.** Hydrolyse de l'amidon par la souche OR1; **B.** Hydrolyse de la gélatine par la souche Ez18. Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Ericsson Cyber-shot DSC (zoom x2).

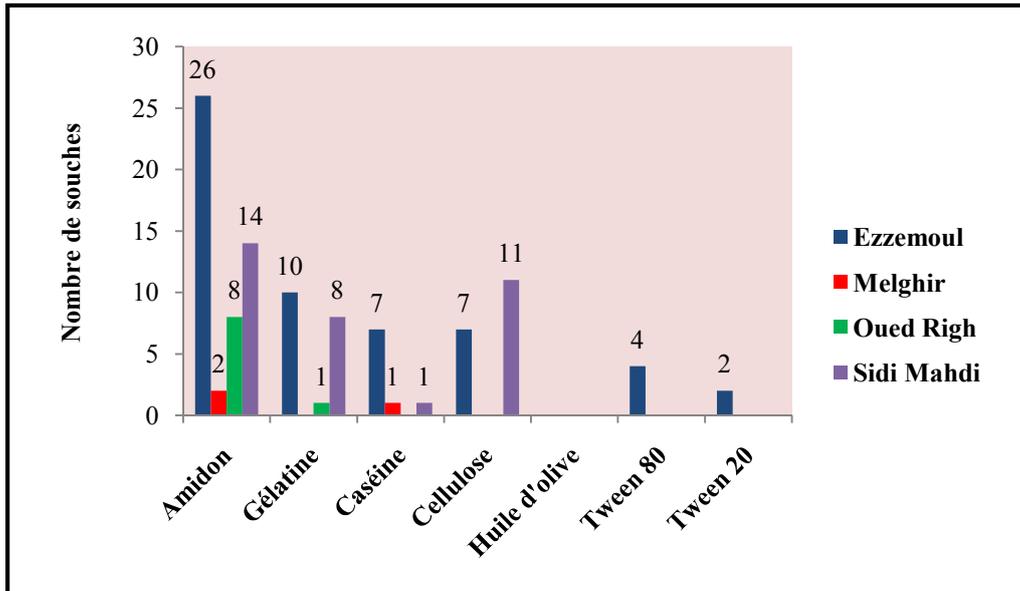


Figure 8. Effectifs des souches ayant pu hydrolyser les polymères tests, réparties selon leur lieu d'isolement.

Il est également intéressant de noter que des activités hydrolytiques combinées ont été détectées chez plusieurs souches (Figure 9). Selon les résultats obtenus, les souches à Gram positifs possèdent plus d'activités hydrolytiques envers les polymères testés (Figure 10).

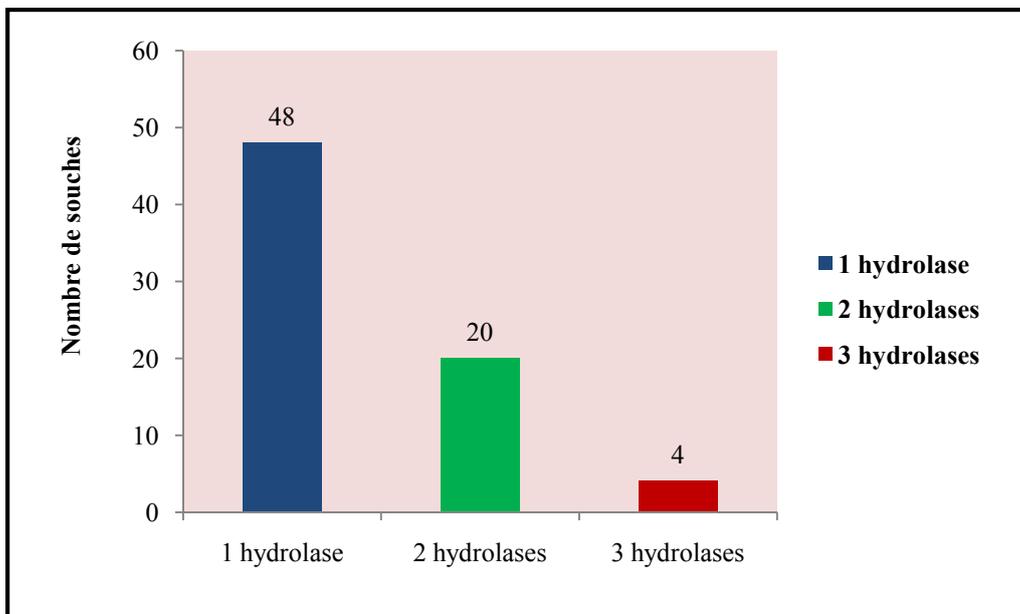


Figure 9. Répartition des souches étudiées par type et fréquence de production des hydrolases extracellulaires.

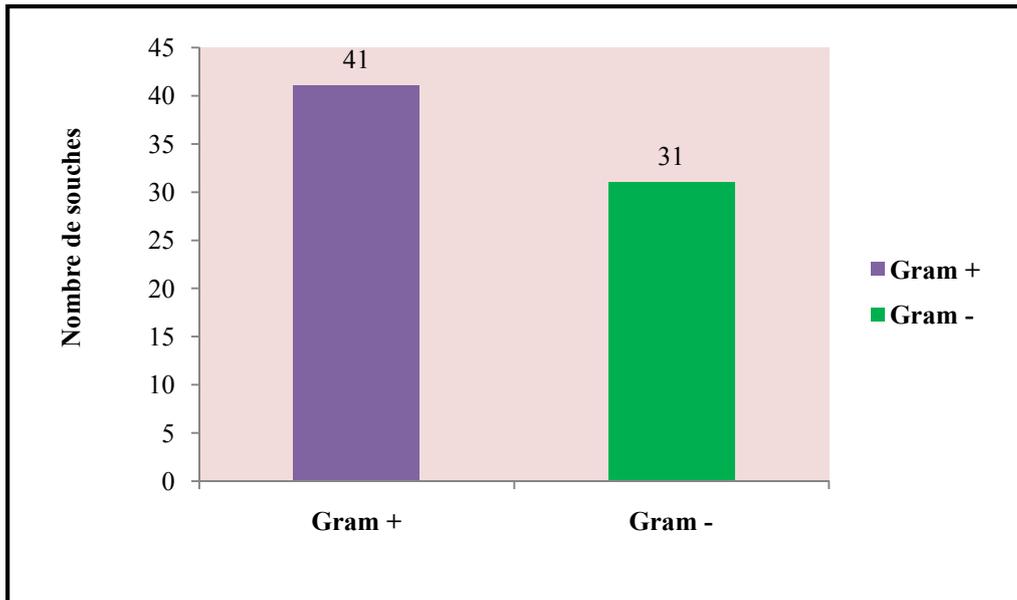


Figure 10. Effectifs des souches à Gram positifs et négatifs ayant pu hydrolyser les polymères testés.

Tableau 10. Caractérisation biochimique des isolats.

Souches	Oxydase	Catalase	Citrate de Simmons	β -galactosidase	ADH	LDC	ODC	Glucose	Lactose et /ou Saccharose	H ₂ S	Gaz	Mannitol	Mobilité	Production	Voges-Proskauer	Rouge de méthyle	Uréase	Amylase	Gélatinase	Caséinase	Cellulase	Hydrolyse de l'huile d'olive	Hydrolyse du Tween 80	Hydrolyse du Tween 20
Ez1	-	+	-	nd	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Ez2	+	+	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-
Ez3	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+ _f	-	-	-	+	+	-	-	-
Ez4	+	+	-	nd	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-
Ez5	+	+	-	nd	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez6	+	+	-	nd	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez7	+	+	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez8	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+ _f	+ _f	-	+	-	+	-	-	-	-
Ez9	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ez10	+	+	-	nd	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ez11	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Ez12	-	+	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez13	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ez14	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez15	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	+	-	-	-
Ez16	+	-	-	+ _f	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+ _f	-	+	-	-	+	-	-	-
Ez17	+	+	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ez18	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Ez19	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Ez20	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	+ _f	-	-	-	+	-	-	-	-

+ , réaction positive; - , réaction négative; f, réaction faible; nd, non déterminé.

Tableau 10. Caractérisation biochimique des isolats (suite).

Souches	Oxydase	Catalase	Citrate de Simmons	β -galactosidase	ADH	LDC	ODC	Glucose	Lactose et /ou Saccharose	H ₂ S	Gaz	Mannitol	Mobilité	Production d'indole	Voges-Proskauer	Rouge de méthyle	Uréase	Amylase	Gélatinase	Caséinase	Cellulase	Hydrolyse de l'huile d'olive	Hydrolyse du Tween 80	Hydrolyse du Tween 20
Ez21	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Ez22	+	+	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+ _f	-	-	+	-	-	-	-	+
Ez23	+	+	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+ _f	+ _f	-	-	-	+ _f	-	-	-
Ez24	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Ez25	+	+	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez26	-	+	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez27	+	+	-	nd	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Ez28	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Ez29	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez30	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+ _f	+ _f	-	-	-	-	-	-	-
Ez31	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+ _f	-	+	+	-	+	-	-	-
Ez32	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+ _f	+ _f	-	-	+	-	-	-	-	-
Ez33	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+ _f	+	-	-	-	+ _f	-	-	-
Ez34	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+ _f	-	-	-	-	-	-
Ez35	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez36	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez37	+	-	-	nd	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez38	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	+	-	-	-	-	-	-	-
Ez39	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+ _f	-	-	-	-	-	-
Ez40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	+	-	-	-	+	+ _f	-	-	-	-	-	-

+, réaction positive; -, réaction négative; f, réaction faible; nd, non déterminé.

Tableau 10. Caractérisation biochimique des isolats (suite).

Souches	Oxydase	Catalase	Citrate de Simmons	β -galactosidase	ADH	LDC	ODC	Glucose	Lactose et /ou Saccharose	H ₂ S	Gaz	Mannitol	Mobilité	Production d'indole	Voges-Proskauer	Rouge de méthyle	Uréase	Amylase	Gélatinase	Caséinase	Cellulase	Hydrolyse de l'huile d'olive	Hydrolyse du Tween 80	Hydrolyse du Tween 20	
Ez41	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
Ez42	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-
Ez43	-	-	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Ez44	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+ _f	-	-	-	-	-	-	-
Ez45	-	+	-	nd	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+ _f	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez46	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+ _f	+	+ _f	-	-	-	-	-	-	-
Ez47	+	-	-	nd	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez48	+	+	-	+ _f	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Ez49	+	+	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez50	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+ _f	-	-	-	-	-	-	-
Ez51	+	+	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-
Ez52	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-
Ez53	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	+	-	-	-	-	-	-
Ez54	+	+	-	nd	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	+	+ _f	-	-	-	-	-	-	-
Ez55	+	-	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+ _f	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez56	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez57	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	+	+ _f	-	-	-	-	-	-	-
Ez58	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez59	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez60	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, réaction positive; -, réaction négative; f, réaction faible; nd, non déterminé.

Tableau 10. Caractérisation biochimique des isolats (suite).

Souches	Oxydase	Catalase	Citrate de Simmons	β -galactosidase	ADH	LDC	ODC	Glucose	Lactose et /ou Saccharose	H ₂ S	Gaz	Mannitol	Mobilité	Production d'indole	Voges-Proskauer	Rouge de méthyle	Uréase	Amylase	Gélatinase	Caséinase	Cellulase	Hydrolyse de l'huile d'olive	Hydrolyse du Tween 80	Hydrolyse du Tween 20
Ez61	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez62	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez63	+	+	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez64	+	+	-	nd	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-
Ez65	+	-	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-
Ez66	+	-	-	nd	-	-	-	+ _f	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez67	+	+	-	nd	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+ _f	-	-	-	-	-	-
Ez68	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+ _f	-	-	-	-	-	-
Ez69	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+ _f	-	-	-	-	-	-
Ez70	+	+	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+ _f	-	-	-	-	-	-
Mg1	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-
Mg2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Mg3	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+ _f	-	-	-	-	-	-
Mg4	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-
Mg5	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Mg6	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mg7	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OR1	+	+	+	nd	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
OR2	+	-	+	nd	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RS3	-	+	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-

+, réaction positive; -, réaction négative; f, réaction faible; nd, non déterminé.

Tableau 10. Caractérisation biochimique des isolats (suite).

Souches	Oxydase	Catalase	Citrate de Simmons	β -galactosidase	ADH	LDC	ODC	Glucose	Lactose et /ou Saccharose	H ₂ S	Gaz	Mannitol	Mobilité	Production d'indole	Voges-Proskauer	Rouge de méthyle	Uréase	Amylase	Gélatinase	Caséinase	Cellulase	Hydrolyse de l'huile d'olive	Hydrolyse du Tween 80	Hydrolyse du Tween 20
RS4	+	+	-	nd	+	+	-	+	+	-	-	+ _f	+ _f	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RS5	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
RS6	+	+	-	nd	+	+	+	+ _f	+ _f	-	-	+	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-
RS7	+	+	-	nd	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-
RS8	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+ _f	-	-	-	-	-	-
MS1	-	+	-	nd	+	+	+	+	+	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MS2	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-
MS3	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
MS4	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
MS5	+	+	-	nd	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
MS6	-	-	-	nd	-	-	-	+ _f	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+ _f	-	-	-
MS7	-	+	-	nd	-	-	-	+ _f	+ _f	-	-	+ _f	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MS8	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
MS9	-	+	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MS10	-	+	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MC11	+	+	-	nd	-	-	+	+ _f	+ _f	-	-	+ _f	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	+	-	-	-
MC12	-	+	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	+ _f	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
MC13	+	+	-	nd	+	+	+	-	-	-	-	+ _f	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
MC14	-	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ _f	-	-	+	-	-	-
MC15	-	+	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	+ _f	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-

+, réaction positive; -, réaction négative; f, réaction faible; nd, non déterminé.

Tableau 10. Caractérisation biochimique des isolats (suite).

Souches	Oxydase	Catalase	Citrate de Simmons	β -galactosidase	ADH	LDC	ODC	Glucose	Lactose et /ou Saccharose	H ₂ S	Gaz	Mannitol	Mobilité	Production d'indole	Voges-Proskauer	Rouge de méthyle	Uréase	Amylase	Gélatinase	Caséinase	Cellulase	Hydrolyse de l'huile d'olive	Hydrolyse du Tween 80	Hydrolyse du Tween 20
MC16	-	-	-	nd	-	-	-	+ _f	+ _f	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
MC17	-	+	-	nd	-	-	-	+ _f	+ _f	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
MC18	-	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
MC19	-	-	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-

+, réaction positive; -, réaction négative; f, réaction faible; nd, non déterminé.

3. Taxonomie numérique

Les résultats de l'étude numérique des caractéristiques phénétiques des 104 souches isolées à Gram positifs et négatifs et des 27 souches de référence groupées par le coefficient de corrélation simple (S_{SM}) et l'algorithme de clustérisation UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) ont donné naissance à 2 dendrogrammes représentés par les figures 11 et 12.

Le premier dendrogramme (Figure 11) regroupant les souches à Gram positifs est formé de 2 groupes et 7 phénons. Le premier composé de 5 phénons liés à 76% de similitude et le second de 2 phénons clustérisés avec 81% de similitude.

➤ Phénon A ($S_{SM} \geq 82\%$), regroupe 17 isolats d'Ezzemoul et la souche de référence *Halobacillus hunannensis*, c'est un groupe homogène dont la majorité de ses souches forment des bâtonnets groupés en paires ou en chainettes, oxydase et catalase positives. Toutes les souches sont apigmentées, halophiles modérées (croissance entre 5,0 et 15,0 %, p/v de sel) et se développent à pH variant de 6,0 à 9,0 et généralement entre 30,0 et 45,0°C. Elles ne produisent pas d'indole, d'H₂S et de CO₂ mais utilisent principalement le glucose, le fructose, le galactose et le maltose comme source unique de carbone et d'énergie, les acides organiques ne sont pas utilisés. L'amidon est hydrolysé par la majorité des souches.

➤ Phénon B ($S_{SM} \geq 83\%$), est composé de 4 souches dont deux souches de référence appartenant au genre *Thalassobacillus* et il est relié au phénon A à 81% de similitude. Ses souches se présentent sous forme de bâtonnets, immobiles, se développent à pH de 6,5 à 8,5 et à une température de 30,0 à 45,0°C. Les colonies sont apigmentées et circulaires à bords réguliers. Elles possèdent une cytochrome oxydase et une catalase et ne produisent pas d'indole, d'acétoïne, d'H₂S et de CO₂ mais produisent des acides mixtes. Le galactose, le saccharose, le lactose, le mélibiose, le mannitol, le glycérol et les trois acides organiques citrate, acétate et oxalate ne sont pas utilisés comme source unique de carbone et d'énergie. Aucune hydrolyse n'est observée pour l'amidon, la gélatine, la caséine, l'huile d'olive et les Tweens 80 et 20.

➤ Phénon C ($S_{SM} \geq 86\%$), c'est un groupe homogène qui comprend 4 isolats des sédiments de Sidi Mahdi et la souche de référence *Salinicoccus iranensis*. Ses isolats se développent entre 5,0 et 12,5% (p/v) de sel, à pH de 7,0 à 8,5 et à une température de 30,0 à 45,0°C. Ils sont négatifs pour les productions de cytochrome oxydase, d'uréase, d'indole, d'acétoïne, d'acides mixtes, d'H₂S et de CO₂. Le saccharose, le lactose et la glycine sont

utilisés comme seule source de carbone et d'énergie mais non les acides organiques. L'amidon et la gélatine sont hydrolysés mais non l'huile d'olive et les Tweens 80 et 20.

➤ Phénon D ($S_{SM} \geq 81\%$), contient 4 isolats collectés des sédiments de Sidi Mahdi près de la source chaude clustérisés avec la souche de référence *Virgibacillus chiguensis*. La majorité des isolats se présentent sous forme de bâtonnets et se développent entre 0,0 et 12,5% (p/v) de sel et sur un intervalle de pH et de température, de 6,0 à 8,5 et de 30,0 à 50,0°C, respectivement. L'ensemble des isolats possède une catalase et ne produit pas d'indole, d'acides mixtes, d'H₂S et de CO₂. L'amidon est hydrolysé mais non l'huile d'olive et les Tweens 80 et 20.

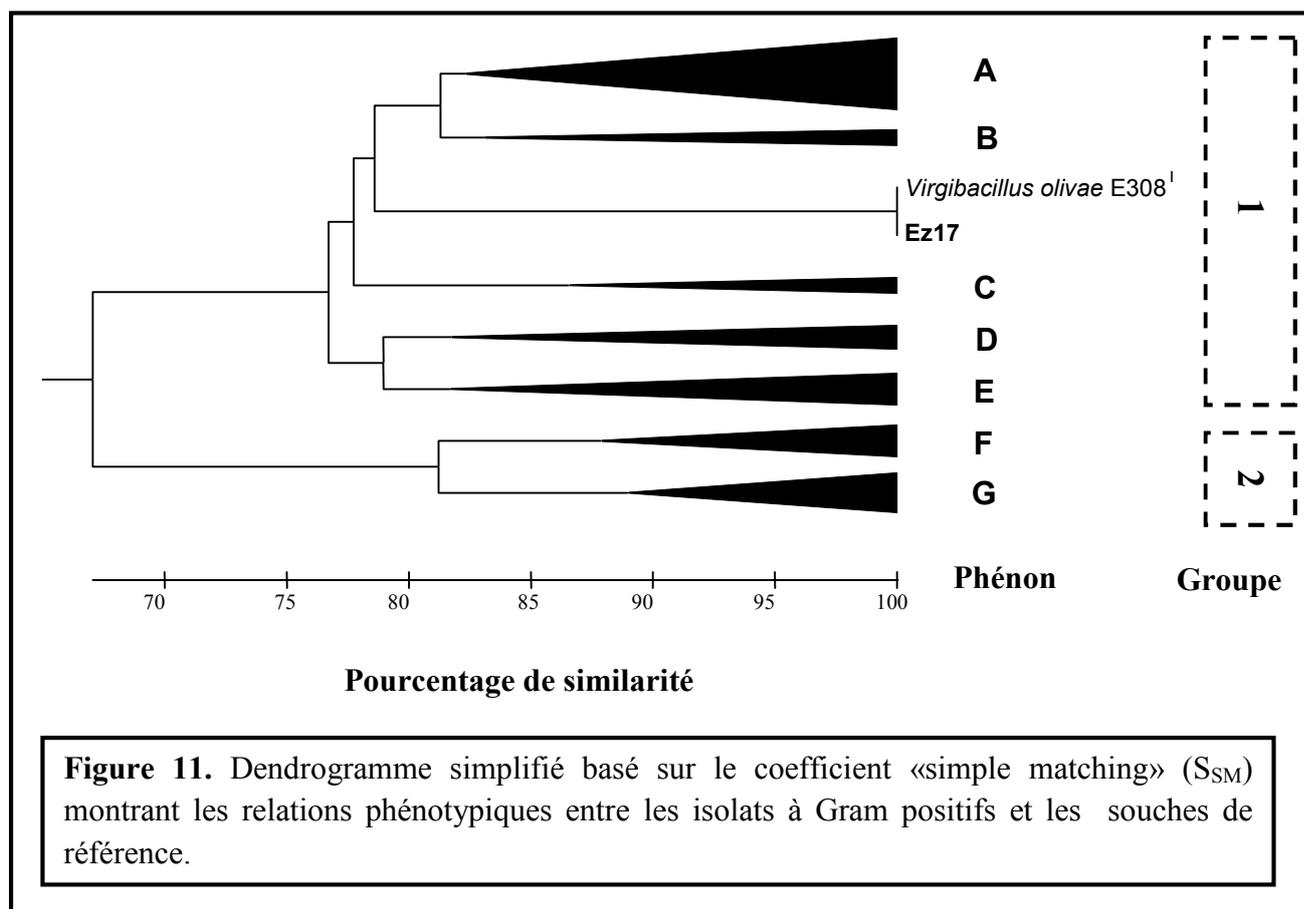
➤ Phénon E ($S_{SM} \geq 81\%$), contient 7 isolats dont 3 proviennent des sédiments de Sidi Mahdi et 4 des échantillons d'eau et des sédiments de Oued Righ clustérisés avec la souche de référence *Salinococcus halodurans*. Ce groupe est relié avec 79% de similarité au phénon D. La majorité de ces isolats sont des bâtonnets et forment des colonies plates et circulaires à bords réguliers. Leur croissance a lieu entre 0,0 et 10,0% (p/v) de sel, à pH variant de 6,5 à 8,5 et sur une gamme de température de 30,0 à 45,0°C. L'indole, les acides mixtes, l'H₂S et le CO₂ ne sont pas produits et l'huile d'olive et les Tweens 80 et 20 ne sont pas hydrolysés.

➤ Phénon F ($S_{SM} \geq 88\%$), groupe homogène contenant 7 souches isolées de la sebkha Ezzemoul et la souche de référence *Gracilibacillus halophilus*. La plupart de ces souches forment des bâtonnets et se développent sur un intervalle de salinité de 15,0 à 30,0% (p/v) et une gamme de pH et de température de 7,0 à 8,5 et de 30,0 à 50,0°C, respectivement. Elles utilisent surtout le saccharose et le glycérol comme unique source de carbone et d'énergie. Les acides organiques et la glycine ne sont pas assimilés. Ces isolats ne produisent pas d'indole, d'acétoïne, d'H₂S et de CO₂ et n'hydrolysent pas la caséine, la cellulose, l'huile d'olive et les Tweens 80 et 20.

➤ Phénon G ($S_{SM} \geq 89\%$), très homogène regroupant 10 isolats de la sebkha Ezzemoul et la souche de référence *Halococcus morrhuae*, membre de la famille des *Halobacteriaceae* (archaea halophile extrême). Ce phénon est clustérisé au phénon précédent à 81% de similitude. Il est composé de souches pigmentées se présentant sous forme de courts bâtonnets et immobiles. La plupart possèdent une cytochrome oxydase et une catalase et se développent sur un intervalle de salinité de 15,0 à 30,0% (p/v), sur une gamme de pH et de température de 6,0 à 8,0 et de 30,0 à 50,0°C, respectivement. Toutes ne produisent pas d'indole, d'acétoïne, d'H₂S et de CO₂ mais utilisent principalement le fructose et le saccharose comme unique source de carbone et d'énergie. Le citrate, l'oxalate et le glycérol ne sont pas assimilés

L'amidon est généralement hydrolysé mais non la caséine, la cellulose, l'huile d'olive et les Tweens 80 et 20.

Par ailleurs, le premier groupe comprend un cluster singulier placé entre les phénons B et C. Il est constitué par un seul isolat (Ez17) lié à la souche de référence *Virgibacillus olivae* à 100%.



Le deuxième dendrogramme (Figure 12) rassemblant les souches à Gram négatifs est composé de 2 groupes et 8 phénons. Le premier composé de 4 phénons liés à 78% de similitude et le second de 4 phénons clustérisés avec 83% de similitude.

➤ Phénon A ($S_{SM} \geq 84\%$), regroupe 13 souches et la souche de référence *Halomonas sabkhae*. Ce sont des bâtonnets arrangés en paires ou en chaînettes et donnent des colonies crèmes, plates et circulaires à bords réguliers. La croissance est observée sur milieu solide à concentration saline finale de 5,0 à 15,0% (p/v), à pH compris entre 6,0 et 9,0 et à une température de 30,0 à 45,0°C. La majorité des souches sont oxydase et catalase positives et utilisent le glucose, le galactose, le fructose, le maltose, le lactose et le mannitol comme source unique de carbone et d'énergie mais non l'acétate, l'oxalate et le citrate. Elles ne

produisent pas d'indole, d'acétoïne, d'acides mixtes, d'uréase, d'H₂S et de CO₂. L'huile d'olive et les Tweens 80 et 20 ne sont pas hydrolysés.

➤ Phénon B ($S_{SM} \geq 86\%$) est homogène et regroupe 3 souches dont 2 isolats des sédiments de Sidi Mahdi qui sont liées à la souche de référence *Marinobacterium maritimum*. Ces souches possèdent une catalase, se développent à des concentrations salines finales de 5,0 à 10,0% (p/v), à pH de 6,5 à 8,5 et une température de 30,0 à 45,0°C. Elles ne produisent pas d'indole, d'acides mixtes, d'H₂S et de CO₂. Ces isolats utilisent le glucose, le lactose, le maltose, le mannitol et la glycine comme seule source de carbone et d'énergie mais non le citrate et l'acétate. L'amidon est hydrolysé alors que les 5 substrats gélatine, caséine, huile d'olive et les Tweens 80 et 20 ne sont pas hydrolysés.

➤ Phénon C ($S_{SM} \geq 84\%$), est formé de 4 isolats de Sidi Mahdi et la souche de référence *Chromohalobacter japonicus* et clustérisé au phénon précédent par un pourcentage de similarité de 79%. Ses souches se développent à des concentrations salines finales de 5,0 à 10,0% (p/v), à pH de 6,5 à 8,5 et une température de 30,0 à 45,0°C. Elles utilisent le glucose, le galactose, le fructose, le lactose, le maltose, le mélibiose, le mannitol et la glycine comme unique source de carbone et d'énergie. Les acides organiques acétate, oxalate et citrate ne sont pas assimilés. L'uréase, l'indole, les acides mixtes, l'H₂S et le CO₂ ne sont pas produits. L'amidon et la cellulose sont hydrolysés mais non l'huile d'olive et les Tweens 80 et 20.

➤ Phénon D ($S_{SM} \geq 78\%$), rassemble 8 souches dont la souche de référence *Chromohalobacter salarius*. Ces isolats forment des bâtonnets et se développent sur un intervalle de salinité de 5,0 à 12,5 % (p/v) et sur un spectre de pH de 6,0 à 8,5 et une gamme de température de 30,0 à 45,0°C. Ils ne produisent pas d'indole, d'acides mixtes, d'H₂S et de CO₂. Le saccharose, le lactose et les acides organiques ne sont pas utilisés comme seule source de carbone et d'énergie par la majorité de ces isolats. L'amidon et la cellulose sont hydrolysés mais non l'huile d'olive et les Tweens 80 et 20.

➤ Phénon E ($S_{SM} \geq 93\%$) est très homogène, formé de 2 souches hautement liées à la souche de référence *Marinobacter szutsaonensis*. Les 2 isolats forment des colonies apigmentées et se présentent sous forme de courts bâtonnets groupés en paires ou en chainettes et ont la capacité de se développer sur, un intervalle de salinité de 20 à 25% (p/v). La croissance est observée entre pH 7,0 et 8,5 et une température située entre 30,0 et 45,0°C. Elles possèdent une cytochrome oxydase et ne produisent pas d'indole, d'acétoïne, d'H₂S et de CO₂. Le glucose, le fructose, le lactose, le maltose, le mannitol, l'acétate ne sont pas utilisés comme unique source de carbone et d'énergie. Ces isolats n'hydrolysent pas la gélatine, la caséine, l'huile d'olive et les Tweens 80 et 20.

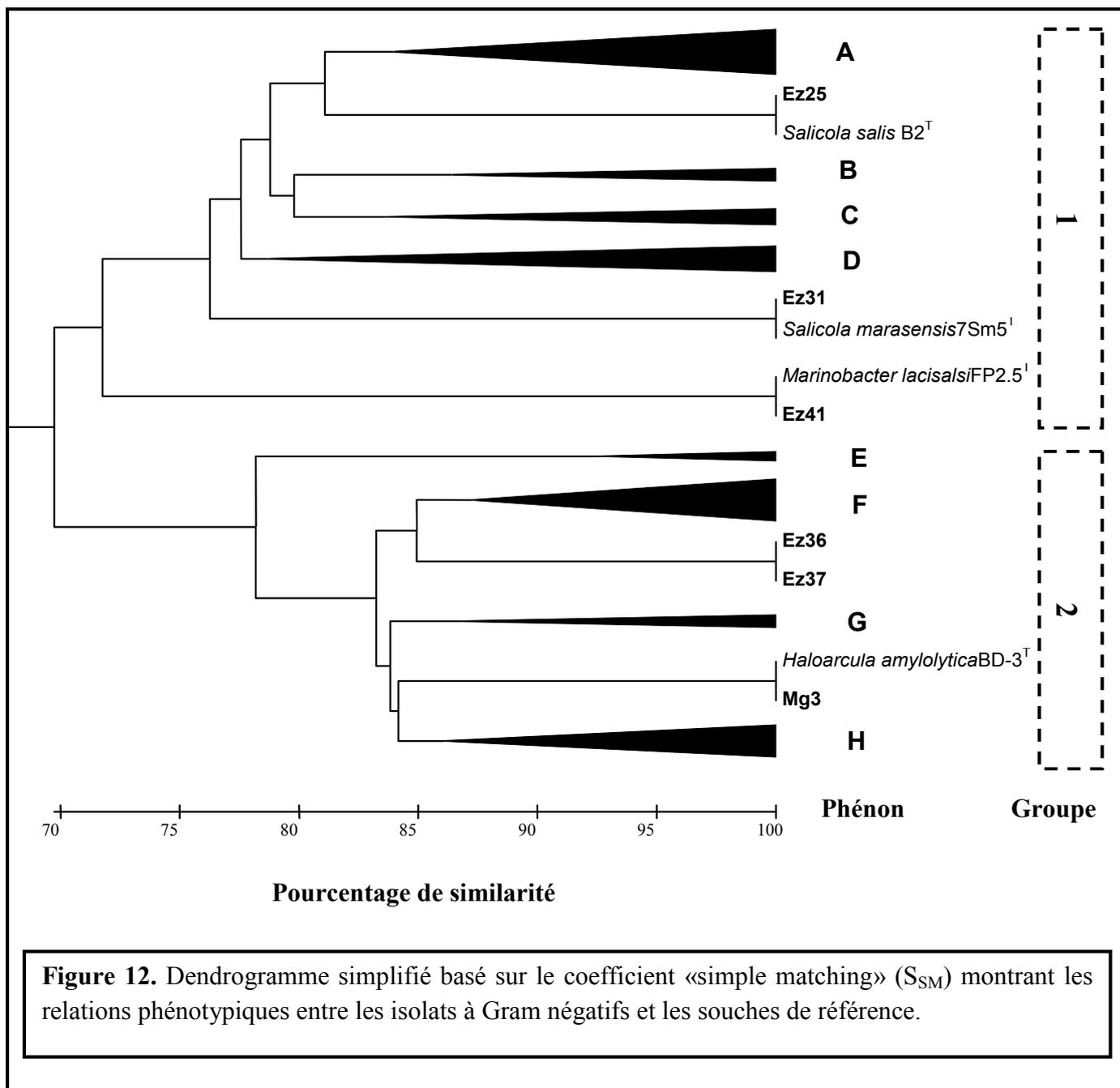
➤ Phénon F ($S_{SM} \geq 87\%$), est formé de 10 souches dont 3 souches de référence appartenant au genre *Halorubrum*, membre de la famille des *Halobacteriaceae*. C'est un groupe homogène qui se présente sous forme de courts bâtonnets arrangés en paires ou en chainettes et oxydase positive. Toutes les souches sont pigmentées et se développent sur un intervalle de salinité de 15 à 30% (p/v) avec un optimum à 25% (p/v), sur un spectre de pH de 6,0 à 8,0 et sur une gamme de température de 30 à 50°C. Elles ne produisent pas d'indole, d'acétoïne, d'acides mixtes mais utilisent surtout le fructose, le saccharose et le glycérol comme unique source de carbone et d'énergie. La caséine, la cellulose, l'huile d'olive et les Tweens 80 et 20 ne sont pas hydrolysés.

➤ Phénon G ($S_{SM} \geq 87\%$), très homogène et regroupe 2 souches isolées du Chott Melghir et 2 souches de références appartenant aux genres archéens *Haloferax* et *Haloterrigena* (*Halobacteriaceae*). Tous les isolats produisent des colonies pigmentées et se présentent en microscopie photonique sous forme de courts bâtonnets groupés en paires ou en chainettes. Ils se développent sur un intervalle de salinité de 20 à 30% (p/v) avec un optimum à 25% (p/v), sur un spectre de pH de 7,0 à 8,5 et une gamme de température de 30 à 50°C. Le saccharose est utilisé comme source de carbone et d'énergie alors que le glucose, le fructose, le mannitol et l'acétate ne sont pas assimilés par ces souches. Toutes sont oxydase et catalase positives mais ne possèdent pas d'uréase et ne produisent pas d'indole, d'acétoïne, d' H_2S et de CO_2 . Les 6 substrats amidon, gélatine, caséine, huile d'olive et Tweens 80 et 20 ne sont pas hydrolysés.

➤ Phénon H ($S_{SM} \geq 86\%$), contient 7 isolats et deux souches de référence archéennes appartenant aux genres *Halobacterium* et *Halomicrobium*. Selon, ce pourcentage de similitude, l'ensemble des souches forment un groupe très homogène. La majorité de ces souches ont en commun les caractéristiques suivantes: courts bâtonnets arrangés en paires ou en chainettes et oxydase positive. Elles se développent toutes sur un intervalle de salinité de 15 à 30% (p/v) avec un optimum à 25% (p/v), sur un spectre de pH de 6,0 à 8,0 et sur une gamme de température de 30 à 50°C. Elles sont pigmentées et ne produisent pas d'indole, d'acétoïne, d' H_2S et de CO_2 . L'ensemble des isolats ne possèdent pas d'uréase. Le glucose, le galactose, le fructose, le lactose, le maltose, le mélibiose, le mannitol, le glycérol, la glycine et les acides organiques ne sont pas utilisés comme seule source de carbone et d'énergie. L'amidon est hydrolysé par la majorité de ces isolats alors que la gélatine, la caséine, la cellulose et les Tweens 80 et 20 ne sont pas hydrolysés.

Ce dendrogramme comprend également 5 clusters singuliers. 3 appartiennent au premier groupe, situés entre les phénons A et B et D et E, respectivement. Ils sont constitués par les

paires de souches Ez25-*Salicola salis* ($S_{SM} \geq 100\%$), Ez31-*Salicola marasensis* ($S_{SM} \geq 100\%$), Ez41-*Marinobacter lacisalsi* ($S_{SM} \geq 100\%$). Pour les 2 autres clusters singuliers, ils appartiennent au second groupe et situés entre les phénons F et G et G et H, respectivement. Le premier est formé par le couple Ez46 et Ez47 présentant un pourcentage de similitude de 100. Tandis que le second est composé d'un isolat Mg3 et d'une souche archéenne de référence *Haloarcula amylolytica*. Les 2 souches sont liées avec un pourcentage de similitude de 100.



4. Discussion

L'étude réalisée sur des échantillons d'eau, de sel et de sédiments collectés à partir de la sebkha Ezzemoul, du Chott Melghir, de Oued Righ et de Sidi Mahdi avait pour objectif la caractérisation phénotypique et la mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des microorganismes halophiles. Les sites étudiés sont des environnements hypersalins où la concentration saline est comprise entre 5% et 30% (p/v), nettement supérieure à celle de l'eau de mer (3,3%, p/v). La plus grande valeur correspond aux saumures de la sebkha Ezzemoul. Quand au pH, il varie de la neutralité à l'alcalinité.

Ce travail a permis l'isolement de 104 souches hétérotrophes et aérobies. Parmi le soucier constitué, 51 isolats se présentent sous forme de cocci ou de bâtonnets courts à Gram positifs à extrémités arrondies, souvent disposés en paires ou en chaînettes et 53 isolats à Gram négatifs. La majorité des souches étudiées sont immobiles.

Une croissance optimale de l'ensemble des isolats est observée à pH variant de 7,0 à 7,5 et à une température de 37 à 40°C. Ce sont donc des neutrophiles et des mésophiles à légèrement thermotolérants (Mégraud, 2011). Selon les optima de salinité, les souches peuvent être classées selon Kushner (1978) en halotolérantes, halophiles faible, halophiles modérées ou halophiles extrêmes. 28 souches forment sur milieux solides des colonies pigmentées en orange, en rouge ou en rose et leur croissance est optimale en présence de 20 ou 25% (p/v) de sel. Ces caractéristiques sont en général, des traits des *Archaea* halophiles extrêmes membres de la famille des *Halobacteriaceae*. La pigmentation est due à la présence d'un caroténoïde de type bactériorubérine (Grant *et al.*, 2001; Oren et Rodriguez-Valera, 2001).

Les sucres sont les plus utilisés comme seule source de carbone et d'énergie par les différents isolats. Par ailleurs, l'oxydation du lactose et/ou du saccharose est plus fréquente que la fermentation du glucose. Cette dernière ne s'accompagne pas d'une production d'H₂S et de CO₂. Le mannitol est également peu fermenté.

La plupart des souches possèdent une cytochrome oxydase et 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).

La production d'acides mixtes et d'acétoïne, est généralement faible. Cependant, 7 souches ont la capacité d'exécuter les deux types de fermentations. Aussi, un seul isolat halophile extrême de la sebkha Ezzemoul possède une tryptophanase responsable de la production

d'indole. L'absence de cette enzyme est fréquente chez ce type de microorganismes (Grant *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009).

Parmi les isolats, 72 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, les isolats de Sidi Mahdi sont cellulolytiques et protéolytiques avec une préférence plus notable pour la dégradation de 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.

Bien que l'hydrolyse des Tweens 20 et 80 soit faible et l'absence de celle de l'huile d'olive, 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 le souchier constitué, quelques souches possèdent des activités hydrolytiques combinées, 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 envers les polymères testés. Ces

résultats sont en accords avec ceux de nombreux auteurs (Sánchez-Porro *et al.*, 2002, 2003; Moreno *et al.*, 2007; Rohban *et al.*, 2009).

La réalisation de la taxonomie numérique a révélé l'existence de 15 phénons, dont 7 sont formés par des souches à Gram positifs et 8 autres composés de souches à Gram négatifs.

Les souches à Gram positifs constituent un ensemble d'isolats biochimiquement versatiles et possédant des similarités avec les genres *Thalassobacillus*, *Gracilibacillus*, *Virgibacillus*, *Halobacillus* et *Salinicoccus* appartenant au phylum des *Firmicutes*. Ce dernier regroupe des membres hautement divers aux niveaux morphologique, physiologique et colonisant une variété d'environnements, tels que les habitats hypersalins (De la Haba *et al.*, 2011).

Quant aux souches halophiles extrêmes et pigmentées sont regroupées dans un seul phénon, très homogène, apparenté à l'espèce archéenne *Halococcus morrhuae* avec 89% de similitude. En ce qui concerne les isolats à Gram négatifs, ils sont inclus dans 8 phénons. Ceux de la sebkha Ezzemoul sont clustérisés avec les genres extrêmement halophile (*Salicola*) et modérés (*Halomonas* et *Marinobacter*). Quant aux isolats de Chott Melghir, de Oued Righ et de Sidi Mahdi, ils semblent phénotypiquement apparentés aux genres *Marinobacterium* et *Chromohalobacter* et sont inclus dans les phénons B, C et D (Figure 11). Ils sont principalement amylolytiques et protéolytiques.

Cette analyse numérique a révélé également que les souches à Gram négatifs et ayant les caractéristiques des haloarchaea (pigmentation, halophile extrême, aérobiose) sont incluses dans trois phénons homogènes F, G et H avec les genres *Halorubrum*, *Halomicrobium*, *Haloferax* et *Haloterrigena*, membres de la famille *Halobacteriaceae*. Un nombre plus important d'isolats est clustérisé avec le genre *Halorubrum*. Les isolats de ces 3 clusters sont pour la plupart amylolytiques.

En comparant la diversité phénotypique des souches isolées de la région de Ain M'Lila et d'El Oued à celles isolées de la région de Touggourt-Ouargla, nous remarquons que les souches de Sidi Mahdi et de Oued Righ sont homogènes et ont tendance à former des phénons à pourcentage de similitude élevé, ceci est due probablement à leur nombre faible par rapport à celui de la sebkha Ezzemoul.

Conclusion générale

et perspectives

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.

Dans cette étude, un screening de plusieurs activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires a été effectué sur 104 souches de microorganismes aérobies halophiles et halotolérants dont 28 ayant des caractéristiques d'haloarchaea, isolées à partir d'échantillons d'eau, de sel et de sédiments récupérés à partir de 4 sites différents: Sebkhâ Ezzemoul à Ain M'Lila, Chott Melghir dans la wilaya d'El Oued et Oued Righ et Sidi Mahdi situés dans la région de Touggourt-Ouargla.

Un milieu de culture spécifique aux halophiles à différentes concentrations salines a servi à l'isolement et à la caractérisation des isolats. Les souches pures sont caractérisées phénotypiquement puis soumises à une recherche qualitative d'activités hydrolytiques. Une analyse numérique est réalisée afin de situer les isolats parmi les souches de référence.

Les salinités des échantillons varient de 5% à 30% (p/v) et le pH est neutre à alcalin. Parmi le soucier constitué, 51 isolats se présentent sous forme de cocci ou de courts bâtonnets à Gram positifs groupés en paires ou en chainettes, le reste est à Gram négatif. La plupart des souches sont immobiles. Des optima de température et de pH sont observés à 7,0-7,5 et 37-40°C, respectivement pour l'ensemble des souches. Leur optimum de salinité a permis de dégager 4 groupes différents de procaryotes; halotolérants et halophiles faibles, modérés ou extrêmes.

La majorité des isolats possèdent une cytochrome oxydase et une catalase. L'assimilation des monosaccharides et les disaccharides comme unique source de carbone et d'énergie est observée mais non celle des acides organiques. Elles ne produisent pas d'indole, d'H₂S, de CO₂.

Ces souches sont étudiées pour la présence de 4 types d'enzymes extracellulaires, importantes industriellement. Dans ce but, 7 différents substrats sont utilisés: amidon, carboxyméthylcellulose, caséine, gélatine, Tween 20, Tween 80 et l'huile d'olive, pour la détermination des activités amylolytique, cellulolytique, protéolytiques et lipolytiques, respectivement. Parmi nos isolats, 72 sont producteurs d'enzymes hydrolytiques extracellulaires. L'activité amylolytique est prédominante mais aucune affinité à l'huile d'olive n'a été détectée.

Il faut noter que les souches isolées de la sebkha Ezzemoul sont beaucoup plus amylolytiques alors que celles de Oued Righ et de Sidi Mahdi sont cellulolytiques et protéolytiques avec une préférence plus notable pour la dégradation de la gélatine. Des activités hydrolytiques combinées sont observées également qui rendent ces isolats plus intéressants pour des applications biotechnologiques.

L'analyse numérique réalisée par les logiciels Taxan 2.0 et MEGA 5.0, en utilisant le coefficient de corrélation simple matching « S_{SM} » et la méthode de clustérisation «UPGMA», a permis de rapprocher phénotypiquement les isolats aux souches de référence. Elle a générée deux dendrogrammes dans lesquels, les 104 souches de l'étude et les 27 souches de référence sont clustérisées en 15 phénons différents, révélant une différenciation spécialement d'ordre biochimique et physiologique.

Cette contribution à l'étude de la mise en évidence d'activités enzymatiques extracellulaires de souches microbiennes isolées d'environnements hypersalins algériens 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.

Du point de vue biotechnologique, les enzymes mises en évidence au cours de cette étude, devront subir une optimisation des conditions de production, une purification et une caractérisation avant d'envisager une future exploitation à l'échelle industrielle. En plus, un clonage de leurs gènes, permettra de surmonter ce problème de haute salinité en créant des espèces nouvelles capables de produire des enzymes recombinées à grande échelle.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

- Aguilera M., Cabrera A., Incerti C., Fuentes S., Russell N.J., Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sánchez M. (2007).** *Chromohalobacter salarius* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Cabo de Gata, Almería, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1238–1242.
- 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 lacisalsi* 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 Poincaré. P. 299.
- Allen M. A., Goh F., Leuko S., Echigo A., Mizuki T., Usami R., Kamekura M., Neilan B.A., Burns B.P. (2008).** *Haloferax elongans* sp. nov. and *Haloferax mucosum* sp. nov., isolated from microbial mats from Hamelin Pool, Shark Bay, Australia. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:798–802.
- 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., Karbalaie-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., Rodríguez-Valera F., Amann R. (2000).** Extremely halophilic Bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl Environ Microbiol* 66 (7): 3052–3057.
- Antón J., Oren A., Benloch S., Rodríguez-Valera F., Amann R., Rosselló-Mora R. (2002).** *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 485–491.
- 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 brine-filled deep of the Red Sea. *J Bacteriol* 190: 3580–3587.

- Antunes A., Rainey F.A., Wanner G., Taborda M., Pätzold J., Nobre M.F., daCosta M.S., Huber R. (2009).** A new lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a brine-filled deep on 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.
- Aubert G. (1975).** Les sols sodiques en Afrique du Nord. *Annales de l'Institut National Agronomique. Alger, Algérie VI*: 185-195.
- 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 α -amylase from a halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. *Braz J Microbiol* 39: 547-553.
- 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.
- Ballais J-L. (2010).** Des oueds mythiques aux rivières artificielles: l'hydrographie du Bas-Sahara algérien. *Géog phys environ* 4: 107-127.
- Barkat S. (2004).** ATLAS ^[IV] des zones humides Algériennes d'importance internationale: 1-107.
- 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 all detectable endoglucanases, exoglucanases and α -glucosidases. *Eur J Biochem* 146: 301-308.
- 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.
- Boumezbeur A. (2003).** Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar, Chott Melghir (Wilaya d'El Oued, Algérie). Pp. 3- 13.
- 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, 2nd edn, vol 2 (The *Proteobacteria*). Springer, New York. P. 1136.
- Buenger J., Driller H. (2004).** Ectoin: an effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacol Physiol* 17: 232–237.
- Bullock C. (2000).** The Archaea a biochemical perspective *Biochem. Mol Biol Edu* 28: 186-19.
- 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., Dyall-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.
- Bursy J., Kuhlmann A.U., Pittelkow M., Hartmann H., Jebbar M., Pierik A.J., Bremer E. (2008).** Synthesis and uptake of the compatible solute ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3 (2) in response to salt and heat stresses. *Appl Environ Microbiol* 74:7286-7296.
- 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., Jiang C-L. (2008).** *Gracilibacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 2403–2408.
- 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.
- Coronado M.J., Vargas C., Hofemeister J., Ventosa A., Nieto J.J. (2000).** Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiol Lett* 183: 67-71.
- 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.

- Cote M. (1999).** Macrocéphalie et micro-urbanisation, cas du Sahara algérien. Actes 2^{ème} Séminaire International de Biskra. Pp. 1 -10.
- 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., 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., 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., 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., 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.
- 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.
- DasSarma, S. (2001).** Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*: 1-9.
- DasSarma P., DasSarma S. (2008).** On the origin of prokaryotic “species”: the taxonomy of halophilic Archaea. *Saline Syst* 4: 5.
- 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.
- 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.
- Denis F., Ploy M.C., Martin M., Bingen E., Quentin R. (2007).** *Bactériologie Médicale. Techniques usuelles*. Edn Elsevier Masson. P. 631.
- 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.

- 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.
- Dinçer A.R., Kargı F. (2001).** Performance of rotating biological disc system treating saline wastewater, *Process Biochem* 36: 901–906.
- Dohrmann A.B., Müller V. (1999).** Chloride dependence of endospore germination in *Halobacillus halophilus*. *Arch Microbiol* 172: 264–267.
- 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.
- 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.
- Dussault H. P. (1955).** An improved technique for staining red halophilic bacteria. *J Bacteriol* 70: 484–485.
- Eichler J. (2001).** Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnol Adv* 19: 261–278.
- Emerson D., Chauhan S., Oriel P., Breznak J. A. (1994).** *Haloferax* sp. D1227, a halophilic Archaeon capable of growth on aromatic compounds. *Arch Microbiol* 161:445–452.
- 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.
- Fan H., Xue Y., Ma Y., Ventosa A., Grant, W. D. (2004).** *Halorubrum tibetense* sp. nov., a novel haloalkaliphilic archaeon from Lake Zabuye in Tibet, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1213–1216.
- Fantazi K. (2001).** 2^{èmes} journées scientifiques de l'INRAA. Station de Touggourt, Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie: 5-49.
- 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.

- Fukushima T., Mizuki T., Echigo A., Inoue A., Usami R. (2005).** *Organic solvent tolerance of halophilic α -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., 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, 2nd edn, The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria. Springer, New York: Pp. 155–166.*
- 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, 2nd edn, (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria). Springer, New York: 1.*
- 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., 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 Molecular Bacteriology. Washington, DC. *ASM. P. 791.*
- Ghanem A. (2007).** Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron 63(8): 1721-1754.*
- Ginzburg B.Z. (1991).** Liquid fuel (oil) from halophilic algae: a renewable source of non-polluting energy in: *General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms*, Rodriguez-Valera F. edn, *Plenum Press, New York: Pp. 389–395.*
- Goldman Y., Garti N., Sasson Y., Ginzburg B.Z., Bloch M.R. (1980).** Conversion of halophilic algae into extractable oils. *Fuel 59: 181–184.*

- Gonzalez C., Gutierrez C., Ramirez C. (1978).** *Halobacterium vallismortis* sp. nov. an amylolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol* 24: 710–715.
- 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- β -xylanase from a newly isolated haloalkaliphilic *Nesterenkonia* sp. *Afr J Biotechnol* 8: 5458-5466.
- Grant W.D., Kamekura M., McGenity T.J., Ventosa A. (2001).** Class III. *Halobacteria* class nov. In: Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 1, 2nd edn, The *Archaea* and the deeply branching and phototrophic *Bacteria*. Springer, New York. Pp. 294–301.
- Grant W.D. (2004).** Life at low water activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359: 1249–1267.
- Greenberg E.P., Canale-Parola E. (1976).** *Spirochaeta halophila* sp. nov. a facultative anaerobe from a high-salinity pond. *Arch Microbiol* 110: 185–194.
- Guiraud J. (1998).** Microbiologie alimentaire. Edition Donod, Paris. Pp. 8-101.
- 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.
- 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.
- 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- β -xylanase from marine *Glaciecola mesophila* KMM 241. *Appl Microbiol Biotechnol* 84: 1107–1115.
- Gupta R., Gigras P., Mohapatran H., Goswami K.V., Chauhan B. (2003).** Microbial α -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.
- Gutiérrez C., Gonzalez C. (1972).** Methods for simultaneous detection of proteinase and esterase in extremely halophilic bacteria. *Appl Microbiol* 24: 516–517.
- Gutiérrez M. C., Castillo A. M., Pagaling E., Heaphy S., Kamekura M., Xue Y., Ma Y., Cowan D. A., Jones B. E., Grant W. D., Ventosa A. (2008).** *Halorubrum kocurii* sp. nov., an archaeon isolated from a saline lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 2031–2035.

- Hacène H., Rafa F., Chebhouni N., Boutaiba S., Bhatnagar T., Baratti J. C., Ollivier B. (2004).** Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea salt Lake, Algerian Sahara. *J Arid Environ* 58: 273-284.
- Harley J.P., Prescott L.M. (2002).** Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edn. P. 449.
- Hartmann R., Sickinger H-D., Oesterhelt D. (1980).** Anaerobic growth of halobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3821–3825.
- 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.
- Hattal A. (2001).** 2^{èmes} journées scientifiques de l'INRAA. Station de Touggourt, Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie. Pp. 5-49.
- Hedi A., Sadfi N., Fardeau M-L., Rebib H., Cayol J-L., Ollivier B., Boudabous A. (2009).** Studies on the Biodiversity of Halophilic Microorganisms Isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under Aerobic Conditions. *Int J Microbiol*: 1-17.
- Hinteregger C., Streichsbier F. (1997).** *Halomonas* sp., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic waste-water. *Biotechnol Lett* 19: 1099–1102.
- 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.
- Hu L., Pan H., Xue Y., Ventosa A., Cowan D. A., Jones B. E., Grant W. D., Ma Y. (2008).** *Halorubrum luteum* sp. nov., isolated from Lake Chagannor, Inner Mongolia, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1705–1708.
- 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.
- INSID : Institut National des Sols, de l'Irrigation et du Drainage (2008).** Sols salins en Algérie. Pp. 1-6.
- 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.
- Joffin J.N., Leyral G. (2006).** Microbiologie technique, tome 1: dictionnaire des techniques 4^{ème} Edn. P. 361.

- 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.
- Kanapathipillai M., Lentzen G., Sierks M., Park C.B. (2005).** Ectoïne and hydroxyectoïne inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid. *FEBS Lett* 579: 4775–4780.
- 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.
- 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., Aguilera M., Quesada T., Morillo A.J., Ramos-Cormenzana A., Boulharouf A., Monteoliva-Sánchez M. (2006a).** *Salicola salis* sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from Ezzemoul sabkha in Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2647–2652.
- 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.
- Kharroub K. (2007).** Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebka Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse de doctorat, Université Mentouri-Constantine. P. 194.
- Kharroub K., Jiménez-Pranteda M.L., Aguilera M., Boulahrouf A., Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sánchez M. (2008a).** *Halomonas sabkhae* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from an Algerian sabkha. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 40–44.
- Kharroub K., Lizama L., Aguilera M., Boulahrouf A., Campos V., Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sánchez M. (2008b).** *Halomicrobium katesii* sp. nov., an extremely halophilic archaeon. *Int J Sys Evol Microbiol* 58: 2354–2358.

- Kim S-J., Park S-J., Yoon D-N., Park B-J., Choi B-R., Lee D-H., Roh Y., Rhee S-K. (2009).** *Marinobacterium maritimum* sp. nov., a marine bacterium isolated from Arctic sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 3030–3034.
- 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 α -amylase gene from the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus* sp. strain Ah-36. *J Bacteriol* 176:5131–5134
- Kocur M., Hodgkiss W. (1973).** Taxonomic status of the genus *Halococcus* Schoop. *Int J Syst Bacteriol* 23:151–156.
- Kovacs N. 1956.** Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, vol 178, 4535: 703–704.
- Kubo M., Hiroe J., Murakami M., Fukami H., Tachiki T. (2001).** Treatment of hypersaline-containing wastewater with salt-tolerant microorganisms. *J Biosci Bioengin* 91: 222–224.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- Lucheta P., Maurel M. C., Higué D. (2005).** Evolution moléculaire. Dunod. Paris. P. 330.
- 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, 2nd edn. Springer, New York. Pp. 49–65.
- 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, 2nd edn, The *firmicutes*. Springer, New York. Pp. 1–13.
- 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.
- Makhdoumi-Kakhki A., Amoozgar 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 halophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 35:55–58.
- Margesin R. Schinner, F. (2001).** Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 563–650.
- Maturrano L., Valens-Vadell M., Rosselló-Mora R., Antón J. (2006).** *Salicola marasensis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from the Maras solar salterns in Peru. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1685–1691.
- McGenity, T. J. et Grant, W. D. (1995).** Transfer of *Halobacterium saccharovorum*, *Halobacterium sodomense*, *Halobacterium trapanicum* NRC 34021 and *Halobacterium lacusprofundi* to the genus *Halorubrum* gen. nov., as *Halorubrum saccharovorum* comb nov.,

Halorubrum sodomense comb nov., *Halorubrum trapanicum* comb. nov., and *Halorubrum lacusprofundi* comb. nov. *Syst Appl Microbiol* 18: 237–243.

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.

Mijts B.N., Patel B.K.C. (2002). Cloning, sequencing and expression of an α -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.

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.

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

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.

Nazarenko E.L., Komandrova N.A., Gorshkova R.P., Tomshich S.V., Zubkov V.A., Kilkoyne M., Savage A.V. (2003). Structures of polysaccharides and oligosaccharides of some nGram-negative marine *Proteobacteria*. *Carbohydr Res* 338: 2449-2457.

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.

Ng W. V., Kennedy S. P., Mahairas G. G., Berquist B., Pan M., Shukla H. D., Lasky S. R., Baliga N. S., Thorsson V., Sbrogna J., Swartzell S., Weir D., Hall J., Dahl T. A. Welti R., Goo Y. A., Leithauser B., Keller K., Cruz R., Danson M. J., Hough D. W., Maddocks D. G., Jablonski P. E., Krebs M. P., Angevine C. M., Dale H., Isenbarger T. A., Peck R.

- F., Pohlschroder M., Spudish J. L., Jung K.-H., Alam M., Freitas T., Hou S., Daniels C. J., Dennis P. P., Omer A. D., Ebhardt H., Lowe T. M., Liang P., Riley M., Hood L., DasSarma S. (2000).** Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc Natl Acad Sci* 97: 12176-12181.
- Nordberg P., Von Hofsten B. (1969).** Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. *J Gen Microbiol* 55: 251-256.
- 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., Gurevich P., Azachi M., Henis Y. (1992).** Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations. *Biodegradation* 3: 387-398.
- Oren A., Ventosa A., Grant W. D. (1997).** Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order *Halobacteriales*. *Int J Syst Bacteriol* 47: 233-238.
- Oren A., Rodriguez-Valera F. (2001).** The contribution of *Salinibacter ruber* species to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiol Ecol* 36: 123-130.
- Oren A. (2002a).** Diversity of halophilic microorganisms: environments phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 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).** Life at high salt concentrations. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E (eds) The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry. Springer, New York 2. Pp. 263-282.
- Oren A. (2008).** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Syst* 4(2): 1746-1448.
- Oren A. (2011).** Diversity of halophiles, In: Horikoshi K. (ed.), Extremophiles Handbook, Springer: 1-1248.
- Peduzzi R., Tonolla M., Boucher-Rodoni R. (2006).** Milieux extrêmes: Conditions de vie en milieu alpin et milieu marin, Actes et contributions scientifiques: 9.
- Peng Q-Z., Peng Q-J., Zhang Y-Q., Liu Z-X., Wang Y-X., Li W-J., Cui X-L., Chen Y-G. (2009).** *Halobacillus hunanensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a subterranean brine. *Antonie van Leeuwenhoek* 96:497-504.
- 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.

- Peyton B.M., Mormille M.R., Alva V., Oie C., Roberto F., Apel W.A., Oren A. (2004).** Biotransformation of toxic organic and inorganic contaminants by halophilic bacteria In: Halophilic Microorganisms (Ventosa A., Ed.) *Springer, Berlin*. Pp. 315–331.
- 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.
- Poitevin B., Anras L., Blachier P., Hussenot J., Lagardère J-P., Lapouyade P., Massé J., Rigaud C. (2004).** Les marais salés atlantiques, mieux connaitre pour mieux gérer. *Cahier technique*: 1-76.
- 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.
- Prakash B., Vidyasagar M., Madhukumar M.S., Muralikrishna G., Sreeramulu K. (2009b).** Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α -amylase from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochem* 44: 210-215.
- Quesada T., Aguilera M., Morillo J.A., Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sánchez M. (2007).** *Virgibacillus olivae* sp. nov., isolated from waste wash-water from processing of Spanish-style green olives. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 906–910.
- Quillaguamán J., Delgado O., Mattiasson B., Hatti-Kaul R. (2006).** Poly (β -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LCI. *Enz Microbiol Technol* 38: 148–154.
- Quillaguamán J., Muñoz M., Mattiasson B., Hatti-Kaul R. (2007).** Optimizing conditions for poly (β -hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LCI 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.
- Raj R., Hemaiswarya S., Rengasamy R. (2007).** Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 517–523.
- 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.

- Receveur V., Czjek M., Schulein M., Panine P., Henrissat B. (2002).** Dimension, shape, and conformational flexibility of two domains fungal cellulases in solution probed by small angle X-ray scattering. *J Biol Chem.* 277 (43): 40887-40892.
- 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.
- Rodríguez -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.
- Rodríguez-Valera F. (1993).** Introduction to saline environments. In: Vreeland R.H., Hochstein L.I (eds) *The biology of halophilic bacteria.* CRC Press Boca Raton FL: 1-23.
- Roessler M., Müller V. (1998).** Quantitative and physiological analyses of chloride dependence of growth of *Halobacillus halophilus*. *Appl Environ Microbiol* 64: 3813-3817.
- Roessler M., Wanner G., Müller V. (2000).** Motility and flagellum synthesis in *Halobacillus halophilus* are chloride dependent. *J Bacteriol* 182: 532-535.
- Roessler 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.
- 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.
- Romano I., Poli A., Finore I., Javier Huertas F., Gambacorta A., Pelliccione S., Nicolaus G., Lama L., Nicolaus B. (2007).** *Haloterrigena hispanica* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Fuente de Piedra, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1499–1503.
- Romano Mwirichia A. W., Muigai B., Tindall H. I., Boga E., Stackebrandt. (2010).** Isolation and characterisation of bacteria from the haloalkaline Lake Elmenteita, Kenya. *Extremophiles* 14:339–348.
- 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.
- Roxana C., Simona M., Gabriela P., Lucia D., Kamekura M., Mădălin E. (2009).** Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal, 5: 4458-4466.

- 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. (2002).** Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *J Appl Microbiol* 94:295–300.
- 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 CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76. *Extremophiles* 7: 221-228.
- Sánchez-Porro C., Tokunaga H., Tokunaga M., Ventosa A. (2007).** *Chromohalobacter japonicus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a Japanese salty food. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 2262–2266.
- Sánchez-Porro C., Amoozegar M. A., Rohban R., Hajighasemi M., Ventosa A. (2009).** *Thalassobacillus cyri* sp. nov., a moderately halophilic Gram-positive bacterium from a hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2565–2570.
- 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.
- Sapin J. (2009).** L'archéologie de la mer Morte, géographie et climat de la mer Morte. *Revue d'archéologie et d'histoire*: 1-63.
- 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.
- Setati M.E. (2009).** Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria. *Afr J Biotechnol* 9 (11): 1555-1560.
- Setyorini E., Takenaka S., Murakami S, Aoki K. (2006).** Purification and characterization of two novel halotolerant extracellular protease from *Bacillus subtilis* strain FP-133. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 433-440.
- 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 α -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 mannanylyticum* 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.
- Shivanand P., Jayaraman G. (2009).** Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochem* 44 (10): 1088-1094.
- Sigurðsladóttir S., Konraosdóttir M., Jonsson A., Kristjánsson J.K., Matthiasson E. (1993).** Lipase activity of thermophilic bacteria from icelandic hot springs. Volume15, Number 4: 361-366.
- Sinsuwan S., Rodtong S., Yongsawatdigul J. (2008).** Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. *Process Biochem* 43: 185–192.
- Sokal R., Michner C. (1958).** A statistical method for evaluating systematic relationships. University of Kansas Science Bulletin 38: 1409-1438.
- Sorokin D.Y., Tourova T.P., Galinski E.A., Belloch C., Tindall B.J. (2006a).** Extremely halophilic denitrifying bacteria from hypersaline inland lakes, *Halovibrio denitrificans* sp. nov. and *Halospina denitrificans* gen. nov., sp. nov., and evidence that the genus name *Halovibrio Fendrich* with the type species *Halovibrio variabilis* should be associated with DSM 3050. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:379–388.
- 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.
- Subov N.N. (1931).** Oceanographical Tables. Moscow: USSR Oceanographic Institute Hydrometeorological Commission: 1-146.
- Szabolcs I. (1989).** Salt Affected Soils. *CRC Press, nonda, USA*. P. 274.
- Tabouche N., Achour S. (2004).** Etude de la qualité des eaux souterraines de la région orientale du Sahara septentrional algérien. *Larhyss Journal* 3:99-113.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011).** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.

- Tan T.C., Mijts B.N., Swaminathan K., Patel B.K.C., Divne C. (2008).** Crystal structure of the polyextremophilic α -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.
- 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.
- Tomlinson, G. A. et Hochstein, L. I. (1977).** *Halobacterium saccharovororum* sp. nov., a carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol* 22:587–591.
- Torreblanca M., Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M., Kates, M. (1986).** Classification of non halophilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition and description of *Haloarcula* gen.nov. and *Halopherax* gen.nov. *Syst Appl Microbiol* 8: 89-99.
- 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.
- Van den Burg B. (2003).** Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opinion Microbiol* 6: 213-218.
- Vargas C., Argandona M., Reina-Bueno M., Rodriguez-Moya J., Fernandez-Aunion C., Joaquin J.N. (2008).** Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance. *Saline Syst* 4: 14.
- Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. (1998).** Biology of aerobic moderately halophilic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 504–544.
- 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).** Purification and characterization of an extreme halothermophilic protease from a halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. TVSP101. *Braz J Microbiol* 40: 12-19.
- Wang C-Y., Chang C-C., Chai Ng C., Chen T-W., Shyu Y-T. (2008a).** *Virgibacillus chiguensis* sp. nov., a novel halophilic bacterium isolated from Chigu, a previously commercial saltern located in southern Taiwan. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 341–345.
- Wang X., Xue Y., Yuan S., Zhou C., Ma Y. (2008b).** *Salinicoccus halodurans* sp. nov., a moderate halophile from saline soil in China. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1537–1541.

- 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.
- 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.
- Yachai M., Tanasupawat S., Itoh T., Benjakul S., Visessanguan W., Valyasevi R. (2008).** *Halobacterium piscisalsi* sp. nov., from fermented fish (pla-ra) in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 2136–2140.
- Yachai M. (2009).** Carotenoid production by halophilic Archaea and its applications. Thesis of Doctorat, university Prince of Songkla. P. 173.
- Yang Y., Cui H-L., Zhou P-J., Liu S-J. (2006).** *Halobacterium jilantaiense* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a saline lake in Inner Mongolia, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2353–2355.
- Yang Y., Cui H-L., Zhou P-J., Liu S-J. (2007).** *Haloarcua amyolytica* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from Aibi salt lake in Xin-Jiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 103–106.
- 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.
- 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.
- Zalar P., de Hoog G.S., Gunde-Cimerman N. (1999).** Ecology of halotolerant *dothideaceous* black yeasts. *Studies in Mycology* 43: 38–48.
- Zavaleta A.I., Cardenas-Fernandez A.M. (2007).** Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes isolated from Pilluana salt brine in Peru. *Halophiles-2007congress booklet*: 50–51.
- 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.
- 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.

Annexes

Annexe 1

➤ **Composition des milieux et réactifs (Harley et Prescott, 2002)**

Réactif de Barritt (réaction de Vogues Proskauer).

Solution 1: 6 g d' α -naphthol dans 100 ml d'alcool éthylique à 95%,

Solution 2: 40 g d'hydroxyde de potassium dans 100 ml d'eau (à conserver au réfrigérateur).

Réactif au rouge de méthyl (Recherche d'acides) (pour 500 ml). 0.1 g de rouge de méthyl dans 300 ml d'alcool éthylique à 95%, compléter jusqu'à 500 ml avec de l'eau distillée.

Réactifs de la coloration de Gram :

- Solution d'acide acétique à 2% : 2ml d'acide acétique ajoutés à 100ml d'eau distillée ;
- Solution de violet de gentiane : 1g de violet de gentiane ; 10ml d'alcool éthylique à 95% ; 2g de phénol ajoutés à 100ml d'Eau distillée ;
- Solution de lugol de Gram : 1 d'iodure de potassium ; 1gd'iode ajoutés à 300 ml d'eau distillée ;
- Solution de fuschine de ziehl (Guiraud et Galzy, 1980). 1 g de Fuschine ; 10ml d'alcool éthylique à 95%; 5g de phénol ajoutés à 100ml d'eau distillée.

Réactif de Kovacs (pour le test d'indole). 150 ml de N-amyl/isoamyl alcool; 50 ml d'acide hydrochlorique concentré et 10 g de p-diméthylaminobenzaldéhyde.

Réactif de Frazier (pour le test d'hydrolyse de la gélatine). 15g d' HgCl_2 , 20 ml d'HCl concentré ajoutés à 100 ml d'eau distillée.

Préparation des solutions salines

Les solutions salines: 3%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20% et 25% sont les dilutions de la solution mère à 30% de salinité.

Par exemple:

À 5% : on utilise 166.65ml de stock de sel préalablement préparé et on complète le volume avec 833.3 ml d'eau distillée pour obtenir 1litre de la solution saline.

À 7,5% : on utilise 250ml de stock de sel préalablement préparé et on complète le volume avec 750 ml d'eau distillée.

À 20% : on utilise 666.65ml de stock de sel préalablement préparé et on complète le volume avec 333.35 ml d'eau distillée.

Annexe 1

Tableau 12. Milieux de culture utilisés pour la recherche des activités hydrolytiques extracellulaires, tous les pH sont ajustés à $7,2 \pm 0,2$							
Milieu	Amylase	Lipases et estérases			Protéases		Cellulase
		Huile d'olive	Tween 20	Tween 80	Caséine	Gélatine	
Constituant	Quantités (% p/v, v/v)						
NaCl							
NaNO ₃							
MgSO ₄ .7H ₂ O							
MgCl ₂ .6H ₂ O							
KCl							
Fe ₂ (SO ₄). 3H ₂ O							
CaCl ₂ . 2H ₂ O							
NaHCO ₃							
NaBr							
KH ₂ PO ₄							
K ₂ HPO ₄							
Na ₂ SO ₃							
Glucose							
Amidon soluble	1						
carboxyméthycellulose							0,5
Huile d'olive		2,5					
Tween 20			1				
Tween 80				1			
Caséine					1		
Gélatine						0,4	
Extrait de levure	0,3		0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Peptone	0,3		0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Extrait de viande							
Solution saline							
Agar	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2
Eau distillée	100	100	100	100	100	100	100

Annexe 2

Tableau 3. Caractères phénotypiques des souches de référence à Gram positifs utilisés lors de l'analyse numérique.

Caractères phénotypiques	<i>Halobacillus hunanensis</i>	<i>Gracilibacillus halophilus</i>	<i>Thalassobacillus devorans</i>	<i>Thalassobacillus cyri</i>	<i>Virgibacillus chiguensis</i>	<i>Virgibacillus olivae</i>	<i>Salinicoccus halodurans</i>	<i>Salinicoccus iranensis</i>	<i>Halococcus dombrowskii</i>
Pigmentation	Crème	Crème blanchâtre	Crème	Crème beige	Blanche laiteuse	Crème jaunâtre	Blanche	Orange rose	Rouge
Forme	Circulaire Légèrement convexe	Circulaire Convexe	Circulaire Convexe	Circulaire Convexe	Irrégulière Plate	Ovale Plate	Circulaire Légèrement convexe	Circulaire Légèrement convexe	Circulaire Convexe
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Morphologie cellulaire	Bâtonnets	Bâtonnets	Bâtonnets	Bâtonnets	Bâtonnets	Bâtonnets	Cocci	Cocci	Cocci
salinité (% p/v)	2-25	7-30	0,5-20	1-15	0-30	0-20	0-24	1-25	15-30
Optimum de salinité (% p/v)	5-10	15	7,5-10	8,0	5-10	5	8	7,5-10	20-30
pH	6-10	6-9	6-10	7-9,5	5-9	4-8	5,5-9	6,5-10	5,5-7,8
Température	10-40	28-60	15-45	5-45	15-50	20-45	8-43	5-45	28-50
Oxydase	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production d'indole	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Uréase	+	-	NR	-	NR	NR	+	-	-
Réaction de Vogues Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	NR
Réaction au rouge de méthyle	-	-	-	+	-	-	+	-	NR
Production d'H ₂ S	-	-	NR	-	-	NR	+	-	NR
Amylase	-	+	-	+	+	+	-	-	V
Gélatinase	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Caséinase	-	-	-	+	+	+	-	-	-

+, réaction positive; -, réaction négative; NR, Non reporté; V, variable.

Annexe 2

Tableau 3. Caractères phénotypiques des souches de référence à Gram positifs utilisés lors de l'analyse numérique (suite).

Caractères phénotypiques	<i>Halobacillus hunanensis</i>	<i>Gracilibacillus halophilus</i>	<i>Thalassobacillus devorans</i>	<i>Thalassobacillus cyri</i>	<i>Virgibacillus chiguensis</i>	<i>Virgibacillus olivae</i>	<i>Salinicoccus halodurans</i>	<i>Salinicoccus iranensis</i>	<i>Halococcus morrhuae</i>
Hydrolyse de Tween 80	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Utilisation de Glucose	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Galactose	+	NR	-	+	NR	-	-	NR	-
Fructose	-	NR	+	+	+	+	+	+	-
Maltose	+	+	+	+	+	-	+	NR	NR

+, réaction positive; -, réaction négative; NR, Non reporté.

Annexe 2

Tableau 4. Caractères phénotypiques des souches de référence à Gram négatifs utilisés lors de l'analyse numérique.

Caractères phénotypiques	<i>Halomonas sabkhae</i>	<i>Salicola salis</i>	<i>Salicola marasensis</i>	<i>Marinobacter lacisalsi</i>	<i>Marinobacter szutsaonensis</i>	<i>Marinobacterium maritimum</i>	<i>Chromohalobacter japonicus</i>	<i>Chromohalobacter salarius</i>
Pigmentation	Crème	Crème beige	Crème	Jaune	Crème laiteux	Jaune	Crème	Jaune
Forme	Circulaire Convexe	Circulaire Convexe	Circulaire Convexe	Circulaire Convexe	Irrégulière Plate	Circulaire Convexe	Circulaire Convexe	Circulaire Convexe
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-
Morphologie cellulaire	Bâtonnets	Bâtonnets	Bâtonnets	Bâtonnets	Bâtonnets	Bâtonnets	Bâtonnets	Bâtonnets
Salinité (% p/v)	5-25	10-25	10-30	3-15	0-20	0,5-7	5-25	3-25
Optimum de salinité (% p/v)	7,5	15-20	15	7,5	5	1-2	7,5-12,5	7,5-10
pH	6-9	6-9	6-8	5-9	6-8,5	5,5-9	5,5-9	5-9
Température	30-50	30-45	15-50	20-30	35-40	7-37	15-42	15-45
Oxydase	+	+	+	+	+	+	-	-
Catalase	-	+	+	+	+	+	+	+
Utilisation de citrate	+	-	+	+	-	-	+	+
Production d'indole	-	-	-	-	NR	-	-	-
Uréase	-	+	+	-	+	-	-	-
Amylase	-	-	-	-	-	-	-	+
Gélatinase	-	-	+	-	+	-	+	-
Hydrolyse de Tween 80	-	+	NR	+	-	-	-	-
Utilisation de								
Glucose	+	-	+	-	+	-	+	+
Galactose	+	-	+	-	NR	NR	+	-
Fructose	+	NR	+	NR	-	NR	+	+
Sucrose	+	-	+	-	+	-	-	-
Lactose	+	-	+	-	-	NR	-	+
Maltose	+	-	+	-	+	-	-	-
Mannitol	+	-	+	-	NR	-	+	+
Acétate	+	+	+	+	+	+	-	+

+, réaction positive; -, réaction négative; NR, Non reporté.

Annexe 2

Tableau 4. Caractères phénotypiques des souches de référence à Gram négatifs utilisés lors de l'analyse numérique (suite).

Caractères phénotypiques	<i>Halorubrum ezzemoulense</i>	<i>Halorubrum saccharovororum</i>	<i>Halorubrum kocurii</i>	<i>Halorubrum luteum</i>	<i>Halobacterium jilantaiense</i>
Pigmentation	Rouge	Rouge orangée	Rouge	Orange	Rouge
Forme	Circulaire Convexe	Circulaire Convexe	Circulaire Convexe	Circulaire Convexe	Circulaire Elevée
Gram	-	-	-	-	-
Morphologie cellulaire	Bâtonnets	Bâtonnets	Bâtonnets	Bâtonnets pléomorphes	Bâtonnets
Gamme de salinité (% p/v)	15-25	10-30	15-30	15-30	16-31
Optimum de salinité (% p/v)	20	20-28	20	23-25	18-20
pH	6,5-9	6-9	6-9	7,5-10,5	5,5-8,5
Température	22-50	30-56	25-55	17-41	22-55
Oxydase	+	+	+	+	+
Catalase	-	+	+	+	+
Utilisation de citrate	+	+	NR	+	NR
Production d'indole	-	-	-	-	+
Uréase	NR	-	+	NR	+
Amylase	-	-	-	-	-
Gélatinase	-	-	-	+	+
Hydrolyse de Tween 80	-	-	NR	-	-
Utilisation de					
Glucose	+	+	-	+	-
Galactose	-	-	-	-	-
Fructose	-	+	-	-	-
Sucrose	+	+	NR	-	-
Lactose	-	+	-	+	-
Maltose	+	+	-	+	-
Mannitol	+	-	-	+	-
Acétate	+	+	-	-	NR

+, réaction positive; -, réaction négative; NR, Non reporté.

Annexe 2

Tableau 4. Caractères phénotypiques des souches de référence à Gram négatifs utilisés lors de l'analyse numérique (suite).

Caractères phénotypiques	<i>Halobacterium piscisalsi</i>	<i>Halomicrobium katesii</i>	<i>Haloferax elongans</i>	<i>Haloterrigena hispanica</i>	<i>Haloarcula amylolytica</i>
Pigmentation	Rouge	Orange	Rouge	Rouge brillante	Rouge
Forme	Circulaire Elevée	Circulaire NR	Circulaire Convexe	Circulaire Elevée	Circulaire Elevée
Gram	-	-	-	-	-
Morphologie cellulaire	Bâtonnets	Bâtonnets	Bâtonnets	Cocci	Bâtonnets
Gamme de salinité (% p/v)	10-30	20-30	10-30	13-25	12-30
Optimum de salinité (% p/v)	20-25	25	15-20	20	15-20
pH	5-8	6,5-10	7-9	6,5-8,5	6,5-9,0
Température	20-60	35-50	30-55	37-60	20-52
Oxydase	+	+	V	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Utilisation de citrate	+	-	NR	+	NR
Production d'indole	-	-	+	+	+
Uréase	-	NR	NR	NR	NR
Amylase	-	+	+	-	+
Gélatinase	+	+	+	-	+
Hydrolyse de Tween 80	+	+	+	NR	+
Utilisation de					
Glucose	-	+	+	-	+
Galactose	-	+	-	-	+
Fructose	-	+	NR	-	-
Sucrose	-	-	+	-	+
Lactose	+	-	-	NR	-
Maltose	-	+	+	NR	+
Mannitol	-	+	-	NR	+
Acétate	-	+	NR	+	+

+, réaction positive; -, réaction négative; NR, Non reporté; V, variable.

Nom et prénom: **AYAD RIMA**

Année universitaire: **2011-2012**

Thème: **Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des microorganismes halophiles aérobies isolés d'environnements hypersalins de l'Est algérien.**

Nature du diplôme: **Magister en Sciences Alimentaires**

Option: **Biotechnologie Alimentaire**

Résumé

Les formes de vie sur terre sont innombrables, comme les environnements qui les abritent. Celles se développant dans des environnements hostiles sont globalement qualifiées d'extrêmophiles. Les premiers organismes extrêmophiles isolés font partie des organismes halophiles, découverts dans un environnement qu'on croyait dépourvu de vie, d'où son nom : la Mer Morte. Leur résistance aux fortes salinités leur confère des caractéristiques étonnantes, ce qui révèle un véritable atout biotechnologique.

Une étude ayant pour objectif, criblage et production d'hydrolases de microorganismes halophiles isolés d'environnements hypersalins algériens est réalisée. Pour cela, une collection de 104 souches de procaryotes halophiles aérobies isolées à partir des échantillons d'eau, de sel et de sédiments prélevés de quatre sites différents (Sebkha Ezzemoul, Chott Melghir, Oued Righ et Sidi Mahdi) est constituée puis caractérisée phénotypiquement et systématiquement examinée pour détecter la présence qualitative de quatre activités hydrolytiques extracellulaires (amylase, protéase, cellulase et lipase). Une analyse de taxonomie numérique est établie.

Une dominance de courts bâtonnets à Gram positifs groupés en paires ou en chainettes a été enregistrée. L'ensemble des souches présente des optima de pH et de température à 7,0-7,5 et à 37-40°C, respectivement. L'optimum de salinité variant de 0% à 25% (p/v) a permis de révéler des microorganismes halotolérants, halophiles faibles, halophiles modérés et extrêmes. Les activités hydrolytiques dominantes révélées sont de types amylolytique et protéolytique. Plusieurs souches présentent une combinaison d'activités enzymatiques. L'analyse par taxonomie numérique a classé les isolats en 15 phénons, clustérisés sur la base du pourcentage de similitude.

Mots clés: Criblage, halophiles, activité hydrolytique, hypersalin, taxonomie numérique.

Screening for extracellular hydrolytic activities in halophilic aerobic microorganisms isolated from hypersaline environments of the Algerian East.

Abstract

The forms of life on earth are uncountable, as the environments which shelter them. Those developing in hostile environments are globally qualified as extrêmophiles. The first extrêmophilic organisms isolated are a member of halophilic organisms, discovered in an environment which we considered devoid of life, where its name: the Dead Sea. Their resistance in high salinity confers them surprising characteristics, what reveals a real biotechnological trump.

A study having for objective, screening and production of hydrolases of halophilic microorganisms isolated from Algerian hypersaline environments is realized. For that purpose, a collection of 104 halophilic aerobic prokaryotes strains isolated from the samples of water, salt and sediments taken from four different sites (Sebkha Ezzemoul, Chott Melghir, Oued Righ and Sidi Mahdi) is constituted then phenotypically characterized and systematically examined to detect the qualitative presence of four hydrolytic activities (amylase, protéase, cellulase and lipase). A numerical analysis was also made.

A dominance of short rods, Gram positive grouped in pairs or in small chains was recorded. The whole of the strains presents optima of pH and temperature at 7,0-7,5 and 37-40°C, respectively. The optimum of salinity while being varied from 0% to 25% (w/v) made it possible to reveal halotolerant, light halophilic, moderate and extreme halophilic microorganisms. The amylolytic and protéolytic activities were the major hydrolytic activities revealed. Several strains present a combination of enzymatic activities. The numerical analysis allowed to obtain 15 phenons, clustered on the basis of the percentage of similarity between strains.

Key words: Screening, halophilic, hydrolytic activity, hypersaline, numerical taxonomy.

ملخص

تتعدد صور الحياة على وجه الأرض بتعدد البيئات التي تحتويها. إن الكائنات التي تتكاثر في بيئات خالية من كل صور الحياة تسمى غير عادية، حيث أن أول نوع تم اكتشافه هو الكائنات المحبة للملوحة و التي تم عزلها من بيئة كان يظن أنها خالية من الحياة و التي سميت بناءً على ذلك بالبحر الميت. مقاومتها الشديدة للملوحة جعلتها غير عادية و مثيرة للاهتمام من الناحية البيوتكنولوجية. بهدف البحث عن سلالات أحياء مجهرية هوائية محبة للملوحة قادرة على إنتاج إنزيمات الإمامة، تم دراسة عينات من الماء، الملح و رواسب ترابية معزولة من أربع بيئات جزائرية مختلفة (سبخة أزمول، شط ملغير، واد ريغ ومنطقة سيدي مهدي) والتي أدت إلى عزل 104 سلالة ، تم دراسة خصائصها الظاهرية وفحص انتاجها لإنزيمات الإمامة (أميلاز، بروتياز، سلولاز، و ليباز) بالإضافة إلى إخضاعها إلى تصنيف رقمي.

اعتمادا على ما توصلنا له من خلال دراستنا هذه، تبين أن غالبية السلالات المدروسة تظهر على شكل عصيات إيجابية الغرام مجتمعة بشكل ثنائي أو على شكل سلسلة. كل السلالات المدروسة تنمو بشكل مثالي عند قيم للأس الهيدروجيني و الحرارة تتراوح ما بين 7,0-7,5 و 37,0-40,0° على الترتيب. إن تركيز الملوحة المثالي و المتغير من 0 إلى 25% كشف تواجد أربع سلالات، الأولى يمكن لها أن تنمو في وجود الملح ولكن في غيابه بصفة أحسن، الثانية تنمو في وجود الملح و لكن بتركيز خفيف، الثالثة محبة للملح بتركيز متوسط و الرابعة و الأخيرة تنمو في وجود الملح حتى و لو كان تركيزه عال.

البحث عن الأنشطة الإنزيمية أدى إلى اكتشاف سيادة إنزيمي إمامة النشأ و إمامة البروتين بالإضافة إلى إمكانية اجتماع أكثر من نشاط إنزيمي لدى السلالة الواحدة.

التصنيف الرقمي حسب نسبة التشابه الموجودة بين سلالات هذه الدراسة سمح بتقسيمها إلى 15 قسم مختلف.

الكلمات المفتاح: بحث، محبة للملوحة، إنزيمات الإمامة ، عالي الملوحة، تصنيف رقمي.

Communications scientifiques

Les résultats de la présente étude ont été le sujet d'une communication orale à Bejaïa, et une communication affichée à Tlemcen. Les résumés de ces travaux sont présentés ci-dessous.

**Séminaire d'Echange International Aux Interfaces du Développement Durable
Environnement, Développement durable, Eau, Industrie Agro-alimentaire, Santé et Economie**

**Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Les 21 et 22 juin 2011**



Mise en évidence d'enzymes extracellulaires chez des microorganismes halophiles isolés de sebkhas algériennes

Rima AYAD, Mohamed Amine GOMRI, Karima KHARROUB

Résumé

Les formes de vie sur terre sont innombrables, comme les environnements qui les abritent. Celles se développant dans des environnements hostiles sont globalement qualifiées d'extrêmophiles. Les premiers organismes extrêmophiles isolés font partie des organismes halophiles, découverts dans un environnement qu'on croyait dépourvu de vie, d'où son nom : la mer morte. Leur résistance aux fortes salinités leur confère des caractéristiques étonnantes. C'est une aptitude qui se révèle un véritable atout biotechnologique. Une étude ayant pour objectif, criblage et production d'hydrolases de microorganismes halophiles isolés d'environnements hypersalins algériens est réalisée. Pour cela, une collection de bactéries et d'archaea halophiles est constituée puis caractérisée phénotypiquement. Elles sont aussi systématiquement examinées pour détecter la présence qualitative de différentes activités enzymatiques (amylase, gélatinase, lipase..).

Colloque FRD2011 sur la production et la productivité de l'agriculture dans le cadre du développement durable

**Du 12 au 14 décembre 2011
Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen**



Mise en évidence de quelques enzymes extracellulaires chez des microorganismes halophiles isolés de la sebkha Ezzemoul

Rima AYAD, Mohamed Amine GOMRI, Karima KHARROUB.

Résumé

Les formes de vie sur Terre sont innombrables, comme les environnements qui les abritent. Celles survivant dans des conditions hors normes, dans des milieux caractérisés par des conditions physiques et / ou chimiques extrêmes sont qualifiés d'extrémophiles. Les premiers organismes extrémophiles isolés font partie des organismes halophiles qui vivent dans des concentrations de sels très élevées, révélant ainsi un domaine plus prospectif mais prometteur consistant en la caractérisation d'enzymes halophiles. Plusieurs de ces activités enzymatiques peuvent aujourd'hui trouver des applications en biotechnologie. Une étude ayant pour objectif, criblage et production d'hydrolases de microorganismes halophiles isolés d'environnements hypersalins algériens est réalisée. Pour cela, une collection de bactéries et d'archaea halophiles est constituée puis caractérisée phénotypiquement. Elles sont aussi systématiquement examinées pour détecter la présence qualitative de différentes activités enzymatiques (amylase, gélatinase, lipase...).