جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDALLAH DE FES
كلية العلوم ظهر المهراز فاس
FACULTE DES SCIENCES DHAR EL MEHRAZ FES

N° d'Ordre : /2020

Formation Doctorale : Molécules Bioactives, Santé et Biotechnologies

Discipline : Biologie

Spécialité : Biochimie et Biotechnologie

Laboratoire : Laboratoire de Biotechnologie, Environnement, Agro-Alimentaire et Santé (LBEAS)

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

DRISSI KAITOUNI Leïla Batsoule

Caractérisation et Valorisation de Bactéries Halophiles par Etude de leurs Enzymes Hydrolytiques : Cellulase, Amylase, Pectinase, Protéase et Inulinase

Soutenue le 07 / 12 / 2020 devant le jury composé de :

Pr. REMMAL Adnane	***FSDM Fès***	***Président***
Pr. HAJJAJ Hassan	***FS Meknès***	***Rapporteur***
Pr. BELHAJ Abdelhaq	***FS Meknès***	***Rapporteur***
Pr. IBNSOUDA KOURAICHI Saad	***FST Fès***	***Rapporteur***
Pr. SENDIDE Khalid	***AAU Ifrane***	***Examinateur***
Pr. BOUIA Abdelhak	***FSDM Fès***	***Examinateur***
Pr. EL HASSOUNI Mohammed	***FSDM Fès***	***Directeur de thèse***

Année universitaire : 2020/2021

A

Papa, Maman

Mes frères Ismaël et Abdelhadi

Mes grands-parents

Je vous aime

Et

Vous dédie cette thèse

Remerciements

بسم الله الرحمن الرحيم

الحمد لله والشكر لله الواحد الاحد الفرد الصمد، الذي وفقنا لهذا العمل، أما بعد:

عن أبي هريرة، قال: قال رسول الله صلى الله عليه وسلم " من لا يشكر الناس لا يشكر الله "
(جامع الرمذي ح 1954)

Abu Hurayra a rapporté que le Prophète, qu'Allah le bénisse et lui accorde la paix, a dit:

« Celui qui n'est pas reconnaissant au gens, il n'est pas reconnaissant à Allah. »

[Jami` at-Tirmidhi 1954]

Voilà ! Six années se sont écoulées, c'est la fin de cette péripétie. Vient tout naturellement le temps des remerciements, car sans la contribution de nombreuses personnes, ces années de thèse, n'auraient pas pu être aussi intéressantes et enrichissantes.

Je tiens tout d'abord à remercier infiniment mon Directeur de thèse, M. le Pr. Mohammed El Hassouni. Merci de m'avoir fait confiance dès le premier jour, merci pour votre patience et pour m'avoir confié ce sujet de thèse, grâce auquel j'ai pu étudier des micro-organismes et des enzymes extraordinaires qui m'ont permis de diversifier et d'enrichir mes compétences. Merci, cher professeur, de faire du laboratoire un espace où la science se partage et se discute librement, comme avec vos anciens doctorants, maintenant docteurs et professeurs : Asmae, Naïma, Abdenbi et Jaouad frères et sœurs de science, MERCI pour votre écoute, votre partage et votre disponibilité. Je remercie particulièrement Pr. Anissi Jaouad, professeur à l'Université Euro Méditerranéenne de Fès, pour sa disponibilité à la supervision et co-encadrement de mon travail.

Je remercie les membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir étudier avec attention mon travail : M. le Professeur Hajjaj, M. le Professeur Belhaj et M. le Professeur Ibnsouda Kouraichi pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ; A M. le Professeur Bouia et M. le Professeur Sendide, merci d'avoir accepté d'examiner mon travail de recherche; et enfin M. le Professeur Remmal, c'est un honneur et un immense plaisir que vous présidiez ce jury, vous qui avez vu mon évolution, la boucle est maintenant bouclée.

Je tiens aussi à remercier M. le Professeur Mohammed Benlemlih, à l'époque (2013-2015) Directeur du Laboratoire de Biotechnologie (LB) et maintenant Doyen de La Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, de m'avoir accueillie au Laboratoire et de m'avoir donné les moyens de mener à bien cette étude. Je réitère mes remerciements au Professeur Mohammed Merzouki, actuel Directeur du Laboratoire de Biotechnologie renommé Laboratoire de Biotechnologie, Environnement, Agro-alimentaire et Santé (LBEAS) depuis janvier 2020, pour son écoute, pour sa disponibilité et pour son soutien.

Mon plus profond respect et ma gratitude vont aussi aux professeurs de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz et d'autres établissements, toujours à l'écoute, MM. les Professeur Bahhou, Bekkari, Abdellaoui, Taleb, Bensallah, Bari, Dinia. Leurs bons conseils m'ont permis d'apprendre beaucoup sur le métier de chercheur. Merci de m'avoir orientée avec pragmatisme tout au long de ces années de thèse. Merci également pour leur disponibilité, leur réactivité et leur gentillesse.

Je ne peux que remercier infiniment mes collègues de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, pour leur professionnalisme et les relations amicales, conviviales et fraternelles qu'ils ont su créer en dehors et au sein du Laboratoire, où des amitiés indissociables se sont créées. Yousra, ma chère binôme, les mots me manquent car ils ne peuvent résumer ces six ans d'aventure. Merci d'avoir été là à chaque pas, d'avoir partagé avec moi tant de souvenirs. Il y a maintenant 4 ans, s'est greffé à nous une petite sœur laborantine, qui a su s'intégrer au laboratoire et avoir une place bien particulière dans nos cœurs : Soumia ta volonté restera un exemple. Mais aussi, merci à Oumaïma, ton sang froid face à l'attaque de moustiques tout au long de nos nuits de travaux au laboratoire est un souvenir indélébile. Je remercie aussi Fatema Zahrae, Hajar, Halima, Fatiha, Brahim, Hanane et mon cher trio Hanane, Mariam et Aouatef. Merci à nos Docteur(e)s : Fatema, Omar, Jamal, Fouad, Anouar, pour la lueur d'espoir et exemple de réussites. A Mes chers voisins des Laboratoire de Biologie, de Chimie mais aussi de Géologie, merci de me permettre d'appeler la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz ma deuxième maison !

Ce qui me fait penser à ma deuxième famille, ce sont mes amis qui se reconnaîtront, notamment Soukayna. Je ne sais ce que j'aurais fait sans toi. Safae, Rym, Momo et Soukaïna. Amandine, Hassan, Amina, Karim, Lamiss, Essam, Reda, Anas et Ilias. Merci à ma chère (ancienne) maîtresse Catherine Kerbal, pour son soutien et ses encouragements. Merci de votre humour et de votre camaraderie. Votre présence et votre écoute a grandement participé à mon équilibre mental et donc à l'accomplissement de ce travail.

Production scientifique

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire de Biotechnologie (LB), Unité de Biotechnologie des Micro-organismes, renommé depuis janvier 2020 : Laboratoire de Biotechnologie, Environnement, Agro-Alimentaire et Santé (LBEAS) de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, Maroc. Ce travail a été encadré par le Professeur Mohammed El Hassouni et coencadré par le Pr Jaouad Anissi. J'ai bénéficié de la bourse d'Excellence du CNRST de 2014 à 2017.

Les travaux effectués dans cette thèse ont contribué aux publications, aux communications et aux prix et distinctions suivants :

1. Publications :

- Ghomari O, Sounni F, Massaoudi Y, Ghanam J, Drissi Kaitouni LB, Merzouki M, Benlemlih M (2019) Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity. Biotechnology Reports. https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00347.
- Drissi Kaitouni LB, Anissi J, Sendid K, El Hassouni Mohammed (2020) Diversity of hydrolase-producing halophilic bacteria and evaluation of their enzymatic activities in submerged cultures. Annals of Microbiology. DOI : 10.1186/s13213-020-01570-z.

2. Prix et distinctions :

- Participation au concours Régional d'innovation « Innovadays », avec le projet : « Production d'enzymes à partir de bactéries halophiles », le 10 Décembre 2014, à la Faculté des Sciences d'Oujda, Maroc.
- Premier prix du jury au concours National « Ma thèse en 180s », le 12 Juin 2015 à l'auditorium du CNRST à Rabat.
- Finale internationale du concours Francophone « Ma Thèse en 180 secondes » Edition 2015, en qualité de finaliste représentant le Maroc, le 1er Octobre 2015, dans le Grand amphithéâtre de la Sorbonne, Paris, France.

Lien de la vidéo : https://www.youtube.com/watch?v=bTybftOrvTY

- Premier prix du concours « Les Doctoriales 2015 », le 4 et 5 Juin 2015 à l'Université Mohammed Premier d'Oujda.
- Prix de l'excellence de l'université Sidi Mohamed Ben Abdellah-Fès pour l'année universitaire 2014/2015.
- Participation au « TEDxClermont » Edition 2016, par une présentation sous le titre « S'inspirer de la nature pour dépolluer », le 29 Octobre 2016 à Clermont-Ferrand, France.

Lien de la vidéo : https://www.youtube.com/watch?v=Ed_fp9MqNDQ&t=45s

3. Communications affichées :

- Drissi Kaitouni Leila, El Hassouni Mohammed, « Valorisation des bactéries halophiles par étude des enzymes hydrolytiques (Cellulase, Pectinase, Amylase, Inulinase et Protéase) », Forum National des Doctorants du Pôle de Biotechnologie, à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, Maroc, le 13 Novembre 2015.
- Yousra Massaoudi, Leila Drissi Kaïtouni, Mohammed El Hassouni, « Study of hydrolytic enzymes of plant pathogenic bacteria », Forum National des Doctorants du Pôle de Biotechnologie, à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, Maroc, le 13 Novembre 2015.
- Jaouad Anissi, Leila Drissi Kaïtouni, Mohammed El Hassouni, Khalid Sendide, « L'extrait du Kéfir Module de l'activité de Polymérisation/Dépolymérisation des Tubulines », Forum National des Doctorants du Pôle de Biotechnologie, à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, Maroc, le 13 Novembre 2015.
- Yousra Massaoudi, Leila Drissi Kaïtouni, Abdenbi El Karkouri, Mohammed El Hassouni, « Biodiversity of halophilic bacteria from a salty marsh in Taza region, Morocco », 3ème Congrès international « Biotechnologies microbiennes au service du développement : MICROBIOD 3 », à l'Hôtel Avanti Mohammedia-Grand Casablanca, Maroc, du 24 au 26 Octobre 2016.
- Soumia Ait Assou, Youra Massaoudi, Leila Drissi Kaitouni, Jamal Ghanam, Abdenbi El Karkouri, Mohammed El Hassouni, « Screening of actinomycetes producing antimicrobial substances from salty soil in Taza-Morocco region », Le premier Forum national « La Biotechnologie environnementale, une voie vers le développement durable » à la Faculté Polydisciplinaires de Taza, le 22 Novembre 2016.
- Drissi Kaitouni Leila, El Hassouni Mohammed, « Biodiversité et potentiel biotechnologie de bactéries halophiles extrêmes isolées d'une mine de sel à Fès au Maroc », 2ème Edition du Forum National des Doctorants du Pôle de Biotechnologie, à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, Maroc, le 20 Décembre 2016.
- Yousra Massaoudi, Leila Drissi Kaïtouni, Soumia Ait Assou, Jaouad Anissi, Mohammed El Hassouni, « Characterization of halophilic bacteria obtained from two salty biotopes : Dead Sea and Taza marshes », 2ème Edition du Forum National des Doctorants du Pôle de Biotechnologie, à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, Maroc, le 20 Décembre 2016.
- Asmae HOUTI, Saâd RACHIQ, Leila DRISSI KAITOUNI, Abdelhakim EL OUALI LALMI, Mohammed EL HASSOUNI, Kawtar FIKRI BENBRAHIM, « Activité enzymatique des thermophiles des eaux de la station thermale Moulay Yaâcoub », 2ème congrès international : Biotechnologie au Service de la Société « Biotech2017 », à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, Maroc, du 22 au 25 Novembre 2017.

4. Communications orales :

- Drissi Kaitouni Leila, El Hassouni Mohammed, « Caractérisation phénotypique et enzymatique des bactéries halophiles isolées de biotopes marocains », Congrès International : Biotechnologie au

Service de la Société BioSeS 2015, à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, Maroc, le 23 Octobre 2015.

- Drissi Kaitouni Leila, El Hassouni Mohammed, « Isolement de bactéries halophiles à partir des milieux aquatiques salins et étude de leurs enzymes hydrolytiques », Colloque international: Eau, Recyclage et Valorisation des Déchets, ERVD'3, à la Faculté de Médecine et Pharmacie de Fès, Maroc, le 29 Octobre 2016.
- Leila Drissi Kaitouni, Jaouad Anissi, Yousra Massaoudi, Khalid Sendide, Mohammed El Hassouni, « Production and Characterization of Cellulases from Halophilic Bacteria Isolated From Hypersaline Biotopes in Morocco », Colloque International « MICROBIOME FOR HEALTH II 2018 », à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, Maroc, le 30 Octobre 2018.
- Yousra Massaoudi, Jaouad Anissi, Leila Drissi Kaïtouni, Khalid Sendide, Mohammed El Hassouni, "Screening for natural compounds, with antioxidant activity, from halophilic bacteria isolated from the Dead Sea.", Colloque International "MICROBIOME FOR HEALTH II 2018", à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, Maroc, le 30 Octobre 2018.
- Leila Drissi Kaitouni, Jaouad Anissi, Khalid Sendid, Mohammed El Hassouni. « Production, Optimization and biochemical characterization of CMCase and endoglucanase from B. subtilis isolated from a salt Marsh in Taza, Morocco. », Congrès International « VARENA 2019:Valorisation des Ressources Naturelles : De la Recherche Scientifique à la Faisabilité Socio-économique », à la Faculté des Sciences de Rabat les 26, 27 et 28 Juin 2019.

5. Autres présentations :

- Participation à la 1ère édition de la « Rencontre ingénieurs & docteurs », en tant que lauréate du concours national « Ma thèse en 180 secondes », le 1er Juillet 2015 à l'Ecole Mohammadia d'Ingénieurs à Rabat, Maroc.
- Participation au programme d'animation de la première édition du Salon National de la Créativité des Jeunes « IBDAA CHABAB 2015 », du 26 au 28 Novembre 2015 au Centre des Formations et des Rencontres Nationales à Rabat, Maroc.
- Participation aux « Journées les Jeunes & la Science au service du développement », par la présentation de ma prestation au concours International Francophone « Ma Thèse en 180 secondes », le 04 Décembre 2015 au lycée Allal Aouad, Salé, Maroc.
- Participation à une Réunion de la CGEM intitulé « Place de l'Université dans les problèmes Socio-économiques de la Région de Fès-Taza : Débat sur les énergies renouvelables », par la présentation d'un résumé de mon projet de thèse et de son impact socio-économique, le 03 Juin 2016 au siège de la CGEM de Fès, Maroc.
- Participation à la Finale Nationale de la 6ème Edition du Concours International Francophone « Ma Thèse en 180 secondes », Témoignage de mon expérience en tant que finaliste de la deuxième Edition, le 02 Juillet 2019 à l'Amphithéâtre Belmahi, Faculté des Sciences Rabat, Maroc.

6. Comité d'organisation :

- Journée Nationale : Traitement et Valorisation des Sous produits Oléicoles « Perspectives pour un développement durable », au Palais des congrès de Fès, Maroc le 27 Mai 2015.
- Workshop National, « Microbiome and Health Workshop 2017 », à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, Maroc, du 27 au 28 Octobre 2017.
- Journée Nationale, « 1ère Journée Scientifique dédiée aux doctorant(e)s sous le thème Biotechnologie, Ecologie et Valorisation des phyto-ressources », à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, Maroc, le 25 Décembre 2017, en tant que coordinatrice et membre du comité d'évaluation des communications orales.
- Journée Nationale, « 2ème Journée Scientifique dédiée aux doctorant(e)s » sous le thème Biotechnologie, Santé et environnement, à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, Maroc, les 10 et 11 Octobre 2018, en tant que coordinatrice.
- Colloque International, « MICROBIOME FOR HEALTH II 2018 », à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, Maroc, les 29,30 et 31 Octobre 2018.
- Colloque International, « Valorization of Natural and Synthetic Biomolecules in Novel Drug-Vector Nanostructures », à la faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, Maroc, les 15 et 16 Avril 2019.
- 10ème Rencontre National, « Electrochimie, Environnement et développement durable, RNE'10 », Au centre de Conférences Al-Akhawayn d'Ifrane, Maroc, les 18 et 19 Avril 2019.
- 3ème Edition du Forum Economique Fès-Meknès, Au Mariott, Fès, Maroc, les 4, 5 et 6 Décembre 2019.

7. Expérience de Recherche

- Responsable des doctorants du Laboratoire de Biotechnologie et du département de Biologie de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz (2014 - 2019)
- Participation aux Travaux Pratiques de : Licence et Master en Microbiologie et Biologie moléculaire pour les années universitaires 2015-2016, 2016-2017.

Résumé

La recherche de nouvelles enzymes performantes issues de sources naturelles a démontré l'intérêt de l'étude de micro-organismes extrêmophiles. Les micro-organismes halophiles représentent une avancée biotechnologique, car ils se sont adaptés aux conditions d'hyper-salinité environnementale telles que les conditions retrouvées dans la mer Morte ou les mines de sel. La biodiversité microbienne d'environnements extrêmes n'est que très peu étudié au Maroc, à ce jour deux études sont resssencé sur la biodiversité de micro-organismes halophiles d'environements hypersalins marocains.

C'est dans ce contexte que l'étude de la biodiversité de bactéries halophiles d'un site naturel et de deux sites artificiels hypersalins a été réalisée. C'est la première étude sur les bactéries halophiles de sites salins de la région de Fès-Meknès au Maroc. Les sites sont deux marais salants artificiels de la province de Taza et une mine de sel naturelle de la préfécture de Fès. Une caractérisation physico chimiques des différents échantillons des sites de la zone d'étude a permis leurs classifications comme sites hypersalins avec des valeurs élevées de la conductivité electrique. L'étude microbiologique a permis l'isolement et l'obtention d'une collection de 227 isolats, constituée de 19 souches halophiles extrêmes, 35 halotolérantes, 100 modérées et 73 légèrement halophiles. 189 souches dotées d'activité enzymatique ont fait l'objet d'une caractérisation par le moyen d'une combinaison de tests microbiologiques et biochimiques, et parmi eux, 56 souches ont été identifiées via le séquençage de l'ADNr 16S. Les 26 genres identifiés sont connus pour avoir un caractère halophile et largement ressencés dans les environnements hypersalins. La majorité des souches de notre collection sont attribués aux genres : *Bacillus, Brevibacterium, Lentibacillus, Oceanobacillus, Staphylococcus, Pedobacter, Ureibacillus, Puniceicoccus* et *Pelagicoccus*. Une diversité prononcée de 25 genres bactériens est obersvé dans le site 1, le site naturel de l'étude. Trois genres, *Oceanobacillus, Sanguibacter* et *Pelagicoccus* sont pour la première fois, grâce à cette étude, décrits comme halophiles extrêmes.

Dans l'objectif de valoriser ces bactéries halophiles, l'évaluation de la capacité des souches de la collection à produire des enzymes hydrolytiques, à savoir, l'amylase, la cellulase, l'inulinase, la pectinase et la protéase, a été entrepis et les résultats ont montré que 189 souches sont dotées d'au moins une des activités testées, que ce soit qualitativement ou quantitativement. La production d'enzymes hydrolytiques a montré que certaines espèces sont dotées de forte activité enzymatique à forte concentration en sel, notamment l'activité pectinase et inulinase. Une étude plus approfondie de l'activité cellulase des souches halophiles nous a permis de sélectionner la souche *Bacillus subtilis* 99SS2 pour optimiser les conditions de croissance et de production de la cellulase. La caractérisation de son extrait protéique brut a montré, une halo-activation et stabilité à forte concentration en NaCl, une forte activité et stabilité à 60-80°C et en présence de certains tensio-actifs, en plus de son activation par la Mn^{++}. Ces résultats sont en faveur d'une application indistrielle de cet extrait protéique. Cette étud a permis également de démontrer que les bactéries halophiles sont des réservoirs prometteurs d'enzymes à haute potentialité biotechnologique.

Mots-clés : Biotopes hypersalins, Bactéries Halophiles, *Bacillus*, Biodiversité, Enzymes hydrolytiques, Cellulases.

Summary

The microbial biodiversity of extreme environments has been poorly studied, only two studies have been made in Morocco on the biodiversity of halophiles microorganisms in hypersaline environments. In this context, the biodiversity of halophilic bacteria from natural and artificial hypersaline sites was one of the main motivations for this work, which is the first study on halophiles bacteria from saline sites in the Fès-Meknes region in Morocco. The sites are two artificial salt marshes in the province of Taza and a natural salt mine in the prefecture of Fez. A characterization of the different samples of the sites of the study area, allowed their classifications as hypersaline sites.

Isolation yielded to a collection of 227 isolates, consisting of 19 extreme halophilic, 35 halotolerant, and 100 moderate and 73 slightly halophilic strains. The 189 isolates with enzymatic activity were characterized through a combination of microbiological and biochemical tests, and among them, 56 isolates were identified via 16S rDNA sequencing. The 26 genera identified are known to have a halophilic character and are widely found in hypersaline environments. The majority of strains in our collection are attributed to the genera: *Bacillus, Brevibacterium, Lentibacillus, Oceanobacillus, Staphylococcus, Pedobacter, Ureibacillus, Puniceicoccus* and *Pelagicoccus*. A pronounced diversity (25 bacterial genera) is observed in Site 1, the natural site of the study. Three genera: *Oceanobacillus, Sanguibacter* and *Pelagicoccus* are for the first time, thanks to this study, described as extreme halophiles.

The study of halophilic microorganisms represents a biotechnological advance due to their adaptation of extreme conditions of environmental hyper-salinity. In addition to their adaptive capacity, halophilic microorganisms are producers of efficient haloenzymes which have different characteristics and are highly sought after in various industries. These halophilic bacteria of our collection were evaluated by their ability to produce hydrolytic enzymes, namely, amylase, cellulase, inulinase, pectinase and protease. The results showed that 189 strains were endowed with at least one of the activities tested, either qualitatively or quantitatively. The production of hydrolytic enzymes has shown that some species are endowed with strong enzymatic activity at high salt concentration, especially pectinase and inulinase activity. Further study of the cellulase activity of halophilic strains allowed us to select the *Bacillus subtilis* 99SS2 strain to optimize the conditions for cellulase production and growth. The characterization of its crude protein extract has shown: halo-activation and stability at high NaCl concentration, high activity and stability at 60-80 ° C and in the presence of certain surfactants. This shows that halophilic bacteria are promising reservoirs of enzymes with high biotechnological potential.

Keywords: Hypersaline biotopes, Halophilic bacteria, Bacillus, Biodiversity, Hydrolytic enzymes, Cellulases.

ملخص

لم يتم دراسة التنوع البيولوجي الميكروبي للبيئات القاسية إلا قليلاً جدًا ، حتى الآن تم إجراء دراستين في المغرب حول التنوع البيولوجي للهالوفيل في البيئات شديدة الملوحة. في هذا السياق ، كان التنوع البيولوجي للبكتيريا المحبة للملوحة من المواقع الطبيعية والاصطناعية شديدة الملوحة أحد الدوافع الرئيسية لهذا العمل ، وهي الدراسة الأولى على الملوحة من المواقع شديدة الملوحة في منطقة فاس مكناس في المملكة المغربية. الموقعان عبارة عن مستنقعين اصطناعيين لملح في محافظة تازة ومنجم ملح طبيعي في محافظة فاس. سمح توصيف العينات المختلفة للمواقع في منطقة الدراسة ، من بين أمور أخرى ، بتصنيفها على أنها مواقع شديدة الملوحة.

نتج عن العزلة مجموعة من 227 عزلة تتكون من 19 عزلة شديدة الملوحة و 35 سلالة مقاومة للهالوت و 100 سلالة معتدلة و 73 سلالة قليلة الملوحة ، وتم تمييز 189 عزلة ذات نشاط إنزيمي. من خلال مجموعة من الاختبارات الميكروبيولوجية والكيميائية الحيوية ، ومن بينها ، تم تحديد 56 عزلة عبر تسلسل S rDNA16. من المعروف أن الأجناس الـ 26 التي تم تحديدها لها طابع محب للملوحة وتوجد على نطاق واسع في البيئات شديدة الملوحة. تُعزى غالبية السلالات في مجموعتنا إلى الأجناس: *Bacillus* و *Brevibacterium* و *Lentibacillus* و *Oceanobacillus* و *Staphylococcus* و *Pedobacter* و *Ureibacillus* و *Puniceicoccus* و *Pelagicoccus*. لوحظ تنوع واضح (25 جنسًا بكتيريًا) في الموقع 1 ، الموقع الطبيعي للدراسة. ثلاثة أجناس: *Oceanobacillus* و *Sanguibacter* و *Pelagicoccus* هي لأول مرة ، بفضل هذه الدراسة ، وُصفت بأنها ملوثة شديدة.

تمثل دراسة الكائنات الدقيقة المحبة للملوحة طفرة في مجال التكنولوجيا الحيوية لأنها تكيفت مع الظروف البيئية الشديدة الملوحة. بالإضافة إلى قدرتها على التكيف ، فإن الكائنات الحية الدقيقة المحبة للملوحة هي منتجة لأنزيمات هالونزيمات فعالة لها خصائص مختلفة ومطلوبة بشدة في مختلف الصناعات. وقد أدى ذلك إلى تقييم هذه البكتيريا المحبة للملوحة من خلال تقييم قدرة السلالات الموجودة في المجموعة على إنتاج إنزيمات التحلل المائي ، وهي الأميليز ، السليولاز ، الإينولييناز ، البكتيناز والبروتياز. أوضحت النتائج أن 189 سلالة كانت تمتلك نشاطًا واحدًا على الأقل من الأنشطة المختبرة ، نوعًا أو كميًا. أظهر إنتاج الإنزيمات المتحللة للماء أن بعض الأنواع تتمتع بنشاط إنزيمي قوي بتركيز عالٍ من الملح ، خاصة نشاط البكتيناز والأنولييناز. سمحت لنا الدراسة الإضافية لنشاط السليلاز للسلالات المحبة للملوحة باختيار سلالة *Bacillus subtilis* 99SS2 لتحسين ظروف نمو وإنتاج السليولاز. أظهر توصيف مستخلص البروتين الخام: تنشيط الهالة هو الاستقرار عند تركيز عالٍ من كلوريد الصوديوم ، وفعالية عالية وثبات عند 60-80 درجة مئوية وفي وجود بعض المواد الخافضة للتوتر السطحي. وهذا يدل على أن البكتيريا المحبة للملوحة هي مستودعات واعدة من الإنزيمات ذات الإمكانات التكنولوجية الحيوية العالية.

الكلمات المفتاحية: الأحياء الحيوية المفرطة الملوحة ، البكتيريا المحبة للملوحة ، العصوية ، التنوع البيولوجي ، الإنزيمات المتحللة للماء ، السليولاز.

Liste des Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNr16S : Gène de l'ARN16S

AE : Activité enzymatique

Al^{3+} : ion d'aluminium

Arg : Arginine

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

BSA : Bovine Sérum Albumine

BET : Bromure d'éthidium

Ca^{2+} : ion de Calcium

$CaCl_2$: Chlorure de calcium

Cd^{2+} : ion de cadmium

CE : Conductivité Electrique

Cl^- : ion de Chlorure

cm : centimètre

CMC : Carboxymethylcellulose

CO_3^{2-} : ion carbonate ou ion polyatomique

Co^{2+} : ion de cobalt

$CoSO_4$: Sulfate de cobalt

Cr^{2+} : ion de chrome

Cu^{2+} : ion de cuivre

$CuSO_4$: Sulfate de cuivre

°C : Degré Celcius

DBO : Demande Biochimique en Oxygène

DCO : Demande Chimique en Oxygène

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DNase : Désoxyribonucléase

dNTP : Désoxyribonucléotides Triphosphate

DNS : Acide 3,5-dinitrosalicylique

DO : Densité Optique

dS : deciSiemens

EC : Enzyme Commission

EDTA : Ethylène Diamine Tétraacétique

EPB : Extrait protéiqueBrut

EPS : Exopolysaccharides

FDA : Food and Drug Administration

Fe^{2+} : ion de Fer (II) ferreux

Fe^{3+} : ion de Fer (III) ferrique

Gly : Glycine

GPS : Global Positioning System

g/l : Gramme par litre

h : Heure

HCl : Acide chlorhydrique

H_2S : Hydrogène sulfuré

His : Histidine

ICP : Induction Coupled Plasma

I_2 : Iode

KCl : Chlorure de potassium

KH_2PO_4 : Phosphate de monopotassium

KI : iodure de potassium

K^+ : ion potassium

LB : Luria-Bertani

Li^+ : ion lithium

Lys : Lysine

m : Mètre

Mn^{2+} : ion de manganèse

Mg^{2+} : ion de magnésium

$MgCl_2$: Chlorure de magnésium

$MgSO_4$: Sulfate de magnésium

Na^+ : ion sodium

NaCl : Chlorure de Sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

Na_2HPO_4 : Hydrogénophosphate de sodium

NCBI : National Center for Biotechnology Information

Ni^{2+} : ion de nickel

$(NH_4)_2SO_4$: Sulfate d'ammonium

NH_4Cl : Chlorure d'ammonium

PAGE : Polyacrylamide Gel Electrophoresis

pb : Paire de Base

PCR : Polymerase chain reaction

PEG : Polyéthylène glycol

Pfu : *Pyrococcus furiosus*

PGA : Acide Polygalacturonique

pH : Potentiel hydrogène

PHA : Polyhydroxyalcanoates

p/v : poids par volume

rpm : Rotation par minute

SDS : Sodium DodecylSulfate

Ser : Sérine

SO_4^{2-} : ion sulfate

TAE : Tris Acétate EDTA

Taq : *Thermus aquaticus*

TDA : Tryptophane désaminase

Tli : *Thermococcus litoralis*

Tris : Tris(hydroxymethyl)aminomethane

U : Unité

UFC : Unité Formant Colonie

UIBMB : Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire

USDA : United States Department of Agriculture

USA : United States of America

USSLS : United States Salinity Laboratory Staff

UV : Ultra violet

Zn^{2+} : ion de zinc

Liste des Figures

FIGURE 1. QUELQUES SOLUTES COMPATIBLES UTILISES PAR LES ARCHAEA POUR L'OSMOADAPTATION (OREN, 2008). 8
FIGURE 2. ARBRE PHYLOGENETIQUE UNIVERSEL ISSU D'UNE ANALYSE COMPARATIVE DES SEQUENCES DE L'ARNR 16S ET LA DISTRIBUTION DES HALOPHILES. *EN ROUGE LES GROUPES CONTENANT AU MOINS UN HALOPHILE (EDBEIB ET AL., 2016).* 9
FIGURE 3. PRESENTATION SCHEMATIQUE DU MODE D'ACTION DES ENZYMES AMYLOLYTIQUES (BERTOLDO & ANTRANIKIAN, 2001). 18
FIGURE 4. STRUCTURE DU CARBOXYMETHYLCELLULOSE (CMC). 20
FIGURE 5. SCHEMA ILLUSTRANT LES ETAPES DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA CELLULOSE (BEHERA ET *AL.*, 2017). 21
FIGURE 6. PRODUCTION DE FRUCTOSE, FLUCOSE ET FRUCTO-OLIGOSACCHARIDES SUITE A L'ACTION DE L'EXO ET ENDO-INULINASE (SINGH & SINGH 2017). 24
FIGURE 7. LOCALISATION DE LA MINE DE SEL DE JBEL ZALAGH A FES ET DES MARAIS SALANTS DE TAZA AU MAROC. 31
FIGURE 8. IMAGE DU SITE 1 : LA MINE DE SEL DE JBEL ZALAGH (34° 7'34.95"N 4°54'51.67"W). 32
FIGURE 9. IMAGE DU SITE 2 : LE MARAIS SALANT DE MEKNASSA (34°15'50.21"N 4° 3'26.46"W). 32
FIGURE 10. IMAGE DU SITE 3 : LE MARAIS SALANT DE BAB MARZOUKA (34°13'17.29"N 4° 6'24.66"W). 33
FIGURE 11. MATRICE DE CORRELATION ENTRE LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET LA CHARGE BACTERIENNE DES ECHANTILLONS SOLIDE ET AQUEUX DE SITE 1(A), SITE 2 (B) ET SITE 3 (C). 44
FIGURE 12. REPARTITION DES ISOLATS SELON LEURS CROISSANCES A DIFFERENTS PH. 46
FIGURE 13. REPARTITION DES ISOLATS SELON LEURS CROISSANCES A DIFFERENTES TEMPERATURES (°C). 47
FIGURE 14. REPARTITION DES ISOLATS SELON LEURS CROISSANCES EN PRESENCE DE DIFFERENTS SUBSTRATS... 47
FIGURE 15. REGROUPEMENT DES ISOLATS EN FONCTION DE 35 CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES. L'ECHELLE DES VALEURS DE 0 A 5 INDIQUE LA MAGNITUDE DE LA REPONSE AU TEST. 51
FIGURE 16. REGROUPEMENT DES 56 SOUCHES SEQUENCEES EN FONCTION DE LEURS CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES. L'ECHELLE DES VALEURS DE 0 A 5 INDIQUE LA MAGNITUDE DE LA REPONSE AU TEST. 53
FIGURE 17.ARBRE PHYLOGENETIQUE MOLECULAIRE DES 56 BACTERIES HALOPHILES A FORTE ACTIVITE ENZYMATIQUE : ● SOUCHES DU SITE 1, ▲SOUCHES DU SITE 2, ■ SOUCHES DU SITE 3 ET ▼ SOUCHES REFERENCES UTILISEES. LES DISTANCES DES BRANCHES DES ARBRES REPRESENTENT LE TAUX DE SUBSTITUTION DES NUCLEOTIDES ET LA BARRE D'ECHELLE REPRESENTE LE NOMBRE ATTENDU DE CHANGEMENTS PAR POSITION HOMOLOGUE DE NUCLEOTIDE. 55
FIGURE 18. ARBRE PHYLOGENETIQUE MOLECULAIRE JOIGNANT LES VOISINS DE SEQUENCES D'ADNR 16S DE DIVERSES BACTERIES HALOPHILES DU GROUPE A. AVEC : ● SOUCHES DU SITE 1, ▲SOUCHES DU SITE 2 ET ■ SOUCHES DU SITE 3 ET ▼SOUCHES REFERENCES UTILISEES. LES DISTANCES DES BRANCHES DES ARBRES REPRESENTENT LE TAUX DE SUBSTITUTION DES NUCLEOTIDES ET LA BARRE D'ECHELLE REPRESENTE LE NOMBRE ATTENDU DE CHANGEMENTS PAR POSITION HOMOLOGUE DE NUCLEOTIDE. 56
FIGURE 19. PRINCIPE DU DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS PAR LA METHODE UTILISANT LE DNS. 64
FIGURE 20. REVELATION DE L'ACTIVITE CELLULASE PAR LE ROUGE CONGO SUR BOITE M9-CMC A DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN NACL (DE 0.0 M A 4.0 M). 68
FIGURE 21. REGROUPEMENT DES ISOLATS EN FONCTION DE LEURS ACTIVITES ENZYMATIQUES. L'ECHELLE DES VALEURS POUR INDIQUER LES ACTIVITES ENZYMATIQUES CALCULEES ET EXPRIMEES DE 0 A 100 U/MG. 72
FIGURE 22.EFFET DES DIFFERENTES SOURCES DE CARBONE SUR LA CROISSANCE (DO 600 NM) ET L'ACTIVITE ENZYMATIQUE CMCASE DE LA SOUCHE *BACILLUS SUBTILIS* 99SS2 APRES 24H D'INCUBATION A 30°C. (*) SIGNIFICATIF : P < 0.05 85
FIGURE 23. SURFACE DE REPONSE TRIDIMENSIONNELLE POUR LA PRODUCTION DE CELLULASE MONTRANT LES EFFETS DE L'INTERACTIF ENTRE LA CONCENTRATION DE (A) CMC ET L'EXTRAIT DE LEVURE ET DE (B) CMC ET NACL. 87

FIGURE 24. CINETIQUE DE CROISSANCE, DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE ET DE PRODUCTION DE PROTEINE DE LA SOUCHE *BACILLUS SUBTILIS* 99SS2 DANS LE MILIEU M9 ADDITIONNE DE 1.0 M NACL ET DE SUBSTRAT A 1 G/L DE CMC (A), CELLULOSE (B), CELLOBIOSE (C) ET YE : EXTRAIT DE LEVURE (D)..... 88
FIGURE 25. CINETIQUE DE LA VITESSE DE CROISSANCE, DE PRODUCTION DE GLUCOSE ET DE PRODUCTION DE PROTEINE DE LA SOUCHE *BACILLUS SUBTILIS* 99SS2 DANS LE MILIEU M9 ADDITIONNE DE 1.0 M DE NACL ET DE CMC (A), CELLULOSE (B), CELLOBIOSE (C) ET YE : EXTRAIT DE LEVURE (D)..... 89
FIGURE 26. GEL PAGE NATIF DE L'EXTRAIT PROTEIQUE BRUT DE LA SOUCHE 99SS2 PRECIPITE PAR (1) SULFATE D'AMMONIUM A 80% DE SATURATION, (2) SULFATE D'AMMONIUM A 100% DE SATURATION, (3) ACETONE A 80% DE SATURATION ET (4) PEG 6000 A 30% DE SATURATION..... 90
FIGURE 27. GEL PAGE NATIF DES EXTRAITS PROTEIQUES BRUTS DE *BACILLUS SUBTILIS* 99SS2 APRES 24 HEURES D'INCUBATION A 30°C DANS LE MILIEU M9 ADDITIONNE DE (A) CMC, (B) CELLULOSE, (C) CELLOBIOSE OU (D) EXTRAIT DE LEVURE..... 90
FIGURE 28. (A) ACTIVITE SPECIFIQUE DES DIFFERENTS EPB APRES 30 MIN DE REACTION ENZYMATIQUE. (B) ACTIVITE SPECIFIQUE DES DIFFERENTS EPB APRES INCUBATION DE 0 A 5 H..... 91
FIGURE 29. ACTIVITE ENZYMATIQUE (U/MG) DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'EXTRAIT PROTEIQUEBRUT (EPB) DE LA SOUCHE *BACILLUS SUBTILIS* 99SS2. (*) SIGNIFICATIF : $P < 0.05$..... 92
FIGURE 30. L'EFFET DE DIFFERENTS SUBSTRATS SUR L'ACTIVITE CELLULASE RELATIVE (%) DE L'EXTRAIT PROTEIQUEBRUT A 30 MINUTES (A) ET (B) LA STABILITE DE L'ACTIVITE CELLULASE JUSQU'A 5 HEURES D'INCUBATION..... 92
FIGURE 31. EFFET DE LA TEMPERATURE (A) SUR L'ACTIVITE CELLULASE RELATIVE (%) DE L'EXTRAIT PROTEIQUEBRUT ET (B) SA STABILITE..... 93
FIGURE 32. (A) L'EFFET DU PH SUR L'ACTIVITE CELLULASE RELATIVE (%) DE L'EXTRAIT PROTEIQUEBRUT ET (B) SA STABILITE..... 94
FIGURE 33. (A) L'EFFET DE LA SALINITE (NACL) SUR L'ACTIVITE CELLULASE RELATIVE (%) DE L'EXTRAIT PROTEIQUE BRUT ET (B) SA STABILITE. TEMOIN : ACTIVITE A 0 G/L (0.0 M) DE NACL..... 94
FIGURE 34. (A) L'EFFET D'IONS METALLIQUES A 1 MM SUR L'ACTIVITE CELLULASE RELATIVE (%) DE L'EXTRAIT PROTEIQUEBRUT ET (B) SA STABILITE..... 95
FIGURE 35. (A) L'EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN MANGANESE SUR L'ACTIVITE CELLULASE RELATIVE (%) DE L'EXTRAIT PROTEIQUEBRUT ET (B) SA STABILITE..... 96
FIGURE 36. (A) L'EFFET DE POTENTIEL ACTIVATEUR OU INHIBITEUR SUR L'ACTIVITE CELLULASE RELATIVE (%) DE L'EXTRAIT PROTEIQUEBRUT ET (B) SA STABILITE..... 97
FIGURE 37. (A) L'EFFET DE LA COMBINAISON DES PRINCIPAUX ACTIVATEURS SUR L'ACTIVITE CELLULASE RELATIVE (%) DE L'EXTRAIT PROTEIQUEBRUT ET (B) SA STABILITE..... 97

Liste des Tableaux

TABLEAU 1. LES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES ENVIRONNEMENTS EXTREMES LES PLUS ETUDIES. (KRISTJANSSON & HREGGVIDSSON, 1995). 3
TABLEAU 2. CLASSIFICATION DE L'EAU SALINE SELON RHOADES ET *AL.*, 1992. 4
TABLEAU 3. REPARTITION DES SOLS EN FONCTION DE LA CONDUCTIVITE ELECTRIQUE (EC) ET DE LA TENEUR TOTALE EN SELS. 5
TABLEAU 4. CLASSIFICATION DES BACTERIES HALOPHILES SELON LARSEN, KUSHNER, OREN ET VENTOSA. 6
TABLEAU 5. CLASSIFICATION DES BACTERIES HALOTOLERANTES (TIQUIA ET *AL.*, 2007). 7
TABLEAU 6. MICRO-ORGANISMES PRODUCTEURS D'ENZYMES HYDROLYTIQUES ISOLES DE DIFFERENTS MILIEUX HYPERSALINS. *ND : NON DETERMINE.* 16
TABLEAU 7.PROFIL MINERAL DES TROIS SITES DE LA ZONE D'ETUDE. *LA CONCENTRATION EST NOTEE EN G/L POUR LES ECHANTILLONS LIQUIDES (A) ET EN G/G POUR LES ECHATILLONS SOLIDES (B). ND: NON DETERMINE. WS (WATER OF THE SOURCE) : EAU DE LA SOURCE, WM (WATER OF THE MINE) : EAU DE LA MINE, SS (SALT SEDIMENT) : SEDIMENT SALIN, W (WATER OF THE SITE) : EAU DU SITE, S (SOIL) : SOL, M (MUD) : BOUE.* 40
TABLEAU 8. PROPRITETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DES ECHANTILLONS DES TROIS SITES DE LA ZONE D'ETUDE. *WS (W ATER OF THE SOURCE) : EAU DE LA SOURCE, WM (WATER OF THE MINE) : EAU DE LA MINE, SS (SALT SEDIMENT) :SEDIMENT SALIN, W (WATER OF THE SITE) : EAU DU SITE, S (SOIL) : SOL, M (MUD) : BOUE. (A) MINIMUM/MAXIMUM POUR LA SAISON. (B) LA CONDUCTIVITE ET LA SALINITE SONT MESUREES GRACE A « WATER QUALITY INSTRUMENT, YSI SCIENTIFIC ». ND: NON DETERMINE.* 42
TABLEAU 9. DISTRIBUTION DES ISOLATS SELON LES SITES ET TYPES D'ECHANTILLONS. *(A) SOLIDES ET (B) AQUEUX. ND: NON DETERMINE. WS (WATER OF THE SOURCE) : EAU DE LA SOURCE, WM (WATER OF THE MINE) : EAU DE LA MINE, SS (SALT SEDIMENT) : SEDIMENT SALIN, W (WATER OF THE SITE) : EAU DU SITE, S (SOIL) : SOL, M (MUD) : BOUE.* 45
TABLEAU 10. DISTRIBUTION DES ISOLATS SELON LES SITES ET CATEGORIES D'HALOPHILISME. 46
TABLEAU 11. DISTRIBUTION DES DIFFERENTS GENRES MONTRANT DE L'ACTIVITE HYDROLYTIQUE SELON LES TROIS SITES D'ISOLEMENT. 52
TABLEAU 12. PREPARATION DE LA GAMME ETALON DU MALTOSE : 65
TABLEAU 13. PREPARATION DE LA GAMME ETALON DU GLUCOSE : 66
TABLEAU 14. PREPARATION DE LA GAMME ETALON DE L'ACIDE GALACTURONIQUE : 66
TABLEAU 15. PREPARATION DE LA GAMME ETALON DU FRUCTOSE : 66
TABLEAU 16. PREPARATION DE LA GAMME ETALON DE TYROSINE : 67
TABLEAU 17. PREPARATION DE LA GAMME ETALON DE BSA : 67
TABLEAU 18. REPARTITION DES SOUCHES SELON LEURS ACTIVITES ENZYMATIQUES ET SELON LA CONCENTRATION EN NACL TESTEE. 69
TABLEAU 19. GAMMES D'ACTIVITES ENZYMATIQUES D'ENZYMES HYDROLYTIQUES PRODUITES PAR LES 189 SOUCHES HALOPHILES APRES 24H D'INCUBATION A 37°C. LES ACTIVITES ENZYMATIQUES SONT EXPRIMEES EN UI/MG DE PROTEINES EXTRACELLULAIRES TOTALES. 73
TABLEAU 20. COMPOSITION D'UN GEL DE POLYACRYLAMIDE NATIF (PAGE) A 10%. 79
TABLEAU 21. ACTIVITE CELLULASE EN U/MG DES SOUCHES LES PLUS PERFORMANTES A DIFFERENTES CONCENTRATION EN NACL. (-) : PAS DE CROISSANCE. 81
TABLEAU 22. QUANTITE DE PROTEINES DES EXTRAITS PROTEIQUES BRUTS DES SOUCHES CHOISIES POUR L'ETUDE. 82
TABLEAU 23. ACTIVITE ENZYMATIQUE DE 0 1.0 U/ML DES EXTRAITS PROTEIQUES BRUTS DES SOUCHES TESTES A 50µG/ML : 103SS1, 6MS1, 99SS2 ET 109MS1 83
TABLEAU 24. PROPRIETES CULTURALES, MORPHOLOGIQUES, PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DE LA SOUCHE 99SS2. 84
TABLEAU 25. MODELE FACTORIEL SELECTIONNE PAR ANOVA. 86
TABLEAU 26. QUANTITE DE PROTEINE (µG) DE L'EXTRAIT PROTEIQUEBRUT SUR CMC DE LA SOUCHE 99SS2 PRECIPITE PAR DIFFERENTES TECHNIQUES. 90

Liste des Tableaux et Figures des Annexes

Tableau A1.1. Caractéristiques morphologiques des isolats de la collection. Avec les codes suivants : couleur, translucide ou transparent = 0, blanc = 1, beige = 2, rose pâle = 3, jaune pâle = 4, orange pâle = 5 et orange = 6. Les codes de la forme de la colonie : concave et régulière = 0, concave et irrégulière = 1, convexe et régulière = 2, convexe et irrégulière = 3, plate et régulière = 4 et plate et irrégulière = 5.

Tableau A1.2. Antibiogramme des souches de la collection, avec : R= Résistante ; S= Sensible et I= sensible Intermédiaire, Amp : Ampicilline ; Kan : Kanamycine ; AMC-Cla : Amoxicilline-Acide clavulanique ; CIP : Ciprofloxacine ; Cm : Chloramphenicol ; STP : Streptomycine Flu : Flucoxalline.

Tableau A1.3. Liste des souches utilisées comme références et leurs numéros d'accès à leurs séquences ARNr 16S dans la base de données GenBank, ainsi que la concentration en sel qui permet leurs croissances. ND : Non Déterminé.

Figure A2.1. Courbe d'étalonnage du maltose**.**

Figure A2.2. Courbe d'étalonnage du glucose**.**

Figure A2.3. Courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique.

Figure A2.4. Courbe d'étalonnage du fructose**.**

Figure A2.5. Courbe d'étalonnage de la tyrosine**.**

Figure A.6. Courbe d'étalonnage du BSA**.**

Tableau A2.1. Identification biochimique, physiologique et moléculaire des 189 souches dotées d'activité enzymatique (A.E.) de la collection. L'activité enzymatique exprimée en U/mg**.**

Figure A3.1. Cinétique de production de cellulase de la souche *Brevibacterium sp.* 103SS1 à différentes concentrations en NaCl.

Figure A3.2. Cinétique de production de cellulase de la souche *Bacillus sp*. 42WMS1 à différentes concentrations en NaCl.

Figure A3.3. Cinétique de production de cellulase de la souche *Ureibacillus sp.* 20SS1 à différentes concentrations en NaCl.

Figure A3.4. Cinétique de production de cellulase de la souche *Bacillus sp*. 87MS1 à différentes concentrations en NaCl.

Figure A3.5. Cinétique de production de cellulase de la souche *Bacillus atrophaeus* 88WMS2 à différentes concentrations en NaCl.

Figure A3.6. Cinétique de production de cellulase de la souche *Bacillus subtilis* 197WMS3 à différentes concentrations en NaCl.

Figure A3.7. Cinétique de production de cellulase de la souche *Halomonas elongata* 165WMS2 à différentes concentrations en NaCl.

Figure A3.8. Cinétique de production de cellulase de la souche *Bacillus subtilis* 99SS2 à différentes concentrations en NaCl.

Figure A3.9. Cinétique de production de cellulase de la souche *Bacillus safensis* 109MS1 à différentes concentrations en NaCl.

Figure A3.10. Cinétique de production de cellulase de la souche *Bacillus tequilensis* 6MS1 à différentes concentrations en NaCl.

Sommaire

Remerciements
Production Scientifique
Résumé / Summary / ملخص
Liste des Abréviations
Liste des Figures
Liste des Tableaux
Liste des Annexes
Sommaire
Introduction Générale……..…..1

Chapitre 1 : Etude Bibliographique

1. LES ECOSYSTEMES EXTREMES.....3
1.1. NOTION D'ENVIRONNEMENTS EXTREMES …….…….....3
1.2. ENVIRONNEMENTS SALINS ET HYPERSALINS 3
1.2.1. Eaux salées 4
1.2.2. Sols salins 5
2. LES BACTERIES HALOPHILES 5
2.1. NOTION DE MICRO-ORGANISMES EXTREMOPHILES 5
2.2. NOTION DE MICRO-ORGANISMES HALOPHILES 6
2.3. LES TYPES ET CATEGORIES DE BACTERIES HALOPHILES 6
2.4. ADAPTATION DES MICRO-ORGANISMES HALOPHILES 7
2.4.1. La stratégie « Salt-in » ou d'accumulation d'ions inorganiques 7
2.4.2. La stratégie « osmolyte » d'accumulation d'ions organiques ou solutés compatibles 8
2.5. BIODIVERSITE DE MICRO-ORGANISMES HALOPHILES 8
2.5.1. Domaine des Archaea 9
2.5.2. Domaine des Bacteria 9
2.6. LE POTENTIEL BIOTECHNOLOGIQUE DES HALOPHILES 11
2.6.1. Les enzymes 11
2.6.2. Solutés compatibles 11
2.6.3. Production de bio-polymères 12
2.6.4. Bactériorhodopsine 12
2.6.5. Production de sel 13
2.6.6. Fermentation des aliments 13
2.6.7. Traitement des eaux usées 13
3. LES ENZYMES : GENERALITES 14
3.1. NOTION D'EXTREMOZYME 14
3.2. BASE MOLECULAIRE DE L'OSMOADAPTATION DES HALOENZYMES 14
3.3. LES ENZYMES HYDROLYTIQUES 15
3.3.1. Généralité 15
3.3.2. La biodiversité des halophiles producteurs d'enzymes hydrolytiques 15
3.3.3. Conditions de production d'enzymes hydrolytiques par des bactéries halophiles 17
3.3.4. Amylases 17
3.3.5. Cellulases 19
3.3.6. Inulinases 22
3.3.7. Pectinases 24
3.3.8. Protéases 27

CHAPITRE 2: La Zone D'étude et sa Biodiversité Bactérienne Halophile

INTRODUCTION…….....35
MATERIEL ET METHODES…….....34
1. PRESENTATION DE LA ZONE D'ETUDE 31
1.1. LA MINE DE SEL DU JBEL ZALAGHDE FES (SITE 1)….……..34
1.2. LES MARAIS SALANTS DE TAZA……35
1.2.1. Le marais salant de Meknassa (Site 2) 32
1.2.2. Le marais salant de Bab Marzouka (Site 3) 32
2. ECHANTILLONNAGE 33
3. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE LA ZONE D'ETUDE 33
3.1. LE PROFIL MINERAL 33
3.2. LA CONDUCTIVITE ET SALINITE 33

3.3. LA MATIERE ORGANIQUE ET TAUX D'HUMIDITE 33
3.4. LA DBO_5 ET DCO SOLUBLE ET TOTALE 34
3.5. LES SELS TOTAUX DISSOUS 34
4. CORRELATION ENTRE LES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES ET LA CHARGE BACTERIENNE 34
5. ISOLEMENT, PURIFICATION ET CONSERVATION DES SOUCHES 35
6. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES SOUCHES 35
6.1. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE 35
6.1.1. Caractérisation macroscopique* *35
6.1.2. Caractérisation microscopique* *35
6.2. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE 35
6.2.1. Répartition des isolats selon leur halophilisme* *35
6.2.2. Croissance à différents pH* *35
6.2.3. Croissance à différentes températures* *35
6.2.4. Utilisation de substrat carbonaté* *35
6.2.5. Sensibilité aux antibiotiques* *36
6.3. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE 36
7. ETUDE PHYLOGENETIQUE 38
7.1. EXTRACTION RAPIDE DE L'ADN GENOMIQUE 38
7.2. ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE 38
7.3. LA REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE OU TECHNIQUE PCR 38
7.4. SEQUENÇAGE ET ANALYSE DES SEQUENCES 38
RESULTATS ET DISCUSSIONS…….....40
CONCLUSION ET PERSPECTIVES……..58

<u>Chapitre 3 : Criblage des Activités Hydrolytiques de Bactéries Halophiles</u>

INTRODUCTION……..…….....62
MATERIEL ET METHODES……..……63
1. REVELATION DE L'ACTIVITE QUALITATIVE 63
1.1. REVELATION DE L'ACTIVITE AMYLASE 63
1.2. REVELATION DE L'ACTIVITE CELLULASE (CMCASE) 63
1.3. REVELATION DE L'ACTIVITE PECTINASE 63
1.4. REVELATION DE L'ACTIVITE PROTEASE 63
1.5. REVELATION DE L'ACTIVITE INULINASE 64
2. DETERMINTATION DE L'ACTIVITE QUANTITATIVE 64
2.1. PREPARATION DE L'ECHANTILLON A DOSER 64
2.2. DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS 64
2.2.1. Le principe* *64
2.2.2. Le protocole de dosage* *65
2.2.3. Préparation des courbes d'étalonnages* *65
2.3. ACTIVITE PROTEASE : DOSAGE DE LA TYROSINE 66
2.3.1. Le principe* *66
2.3.2. Le protocole de dosage* *66
2.3.3. Préparation de la courbe d'étalonnage* *67
3. DOSAGE DES PROTEINES 67
3.1. LE PRINCIPE 67
3.2. LE PROTOCOLE DE DOSAGE 67
3.3. PRÉPARATION DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE 67
RESULTATS ET DISCUSSIONS……..…….....68
1. REVELATION DE L'ACTIVITE QUALITATIVE 68
2. REVELATION DE L'ACTIVITE QUANTITATIVE 72
2.1. ACTIVITE CELLULASE 73
2.2. ACTIVITE AMYLASE 74
2.3. ACTIVITE PECTINASE 74
2.4. ACTIVITE INULINASE 75
2.5. ACTIVITE PROTEASE 75
CONCLUSION ET PERSPECTIVES……..…….....76

<u>Chapitre 4: Production et Caractérisation de Cellulases</u>

INTRODUCTION……..…77
MATERIEL ET METHODE……78
1. CINETIQUE DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DE CELLULASE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN NACL 78

1.1. CINETIQUE DE CROISSANCE DES SOUCHES LES PLUS PERFORMANTES EN TERMES DE PRODUCTION DE CELLULASE 78
1.2. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DE LA CELLULASE DE *B. SUBTILIS* 99SS2 78
2. PROPRIETES ENZYMATIQUES ET CARACTERISATION DES EXTRAITS PROTEIQUES BRUTS 79
2.1. OBTENTION DE L'EXTRAIT PROTEIQUEBRUT 79
2.2. ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE NATIF (PAGE) 79
2.3. SPECIFICITE DU SUBSTRAT DES EXTRAITS PROTEIQUES BRUTS 80
2.4. CARACTERISATION DE L'EXTRAIT PROTEIQUEBRUT (EPB) : EFFET DE LA TEMPERATURE, PH, SALINITE, SOLVANTS, DETERGENTS ET IONS METALLIQUES SUR L'ACTIVITE CELLULASE 80
RESULTATS ET DISCUSSION……..…….81
1. CINETIQUE DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DE CELLULASE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN NACL 81
2. PROPRIETE ENZYMATIQUE ET CARACTERISATION DES EXTRAITS PROTEIQUES DES 10 SOUCHES SELECTIONNEES 82
2.1. OBTENTION DE L'EXTRAIT PROTEIQUEBRUT 82
2.2. CARACTERISATION DES EXTRAITS PROTEIQUES BRUTS 82
3. CELLULASE DE LA SOUCHE B. SUBTILIS 99SS2 HALOPHILE MODEREE : OPTIMISATION DE LA PRODUCTION ET CARACTERISATION DE L'EXTRAIT PROTEIQUEBRUT 84
3.1. CRIBLAGE ET OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DE LA CELLULASE DE B. SUBTILIS 99SS2 85
3.2. CINETIQUE DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DE CELLULASE 88
3.3. ANALYSE DE L'EXTRAIT PROTEIQUE BRUT DE B. SUBTILIS 99SS2 ……..……..89
3.3.1. Préparation de l'extrait protéique brut et profil protéique* *89
3.3.2. Activité enzymatique des EPB préparés à partir de différents substrats* *90
3.3.3. Caractérisation de l'EPB préparé à partir de CMC (EPB-CMC)* *91
CONCLUSION ET PERSPECTIVES ……..…..……...……..98
Conclusion et perspectives générale……...…….....100
Références Bibliographiques……..…….…….…….....….....103
Annexes

Introduction Générale

La vie sur notre planète est diverse. Bien que nous puissions facilement le remarquer dans notre environnement quotidien, nous observons sous un microscope, un monde encore plus diversifié. Le fait est que les micro-organismes sont omniprésents et dominent notre planète. On les retrouve dans des environnements considérés par l'homme comme inhabitables et/ou extrêmes, comme les sources d'eau chaude, les profondeurs des océans, les calottes glacières, et dans des environnements incompatibles à la vie dite « normale ». Ces micro-organismes dits extrêmophiles représentent, grâce à leurs mécanismes adaptatifs, un réservoir de nouveaux biocatalyseurs et de nouvelles molécules bioactives à fort potentiel biotechnologique (Raddadi et *al.*., 2015). Les premiers extrêmophiles étudiés sont les halophiles qui exigent plus ou moins de fortes concentrations en sel pour leurs croissances, ils colonisent des habitats salins et hypersalins tels que : eau de mer, lac salé, mine de sel et marais salant. Certains écosystèmes hypersalins sont reconnus et largement étudiés, comme le Grand lac salé d'Utah (USA), la Mer Morte, le Lac Magadi (Kenya) et le Salar d'Uyuni (Bolivie).

La recherche d'enzymes hydrolytiques issues de micro-organismes halophiles, a commencé par les études de Nordberg et Hofsten en 1969 (Noberg & Von Hofstn, 1969). S'ensuit de nombreuses études visant leur valorisation pour leurs utilisations dans des processus biotechnologiques. Leurs propriétés physico-chimiques de nature polyextrêmophiles, ont permis aux enzymes halophiles de se positionner comme candidats pour plusieurs applications biotechnologiques et processus industriels.

Au Maroc, peu d'études sont réalisées sur la biodiversité microbienne des biotopes salins Marocains, le Centre d'Echange d'Information sur la Biodiversité du Maroc (Ministère de l'Energie, des Mines, de l'Eau et de l'Environnement ; Département de l'Environnement) a d'ailleurs publié un rapport qui mentionne le nombre relativement faible d'études sur les micro-organismes et leurs diversités: « C'est l'un des groupes qui, malgré son importance capitale sur les plans écologique, scientifique et socio-économique, est très mal connu et très peu étudié au Maroc. On estime à près de 1.120.000 espèces dans le monde dont 143.000 espèces recensées. L'étude Nationale sur la Biodiversité a révélé la présence de 226 espèces au Maroc. C'est un chiffre qui montre l'importance de la lacune qui caractérise les études microbiologiques dans notre pays. Il semble que les micro-organismes sont étudiés dans notre pays essentiellement pour leurs impacts socio-économiques (phytopathogènes, agro-alimentaires, agricoles, etc.). » (http://ma.chm-cbd.net/).

La distribution et biodiversité de micro-organismes halophiles dans de nouveaux écosystèmes hypersalins non étudiés a donc constitué l'axe principal des travaux de cette thèse. La valorisation de ces micro-organismes halophiles a été envisagée grâce à leur potentiel biotechnologique, notamment la production d'enzymes hydrolytiques, avec l'étude plus approfondie de la production de cellulase active à haute concentration de sel.

Le but de cette étude est donc d'améliorer nos connaissances sur la biodiversité bactérienne des halophiles dans des écosystèmes hypersalins de la région de Fès-Meknès et l'étude de leurs enzymes hydrolytiques dans l'objectif de la recherche d'enzymes performantes en condition saline. Pour

répondre à ces objectifs, nous avons effectué des isolements à partir du sol, de l'eau et de la boue de trois sites hypersalins : le site naturel d'une mine de sel de Jbel Zalagh à Fès et deux sites artificiels que sont les marais salants de Bab Merzouka et de Meknassa à Taza dans le but de composer une collection de bactéries halophiles. L'identification et la caractérisation de la collection bactérienne obtenue ont été réalisées par une approche polyphasique après analyse des tests microbiologiques, biochimiques et moléculaires par séquençage de l'ARNr 16S.

La collection a fait l'objet de tests qualitatifs et quantitatifs d'activités enzymatiques (Cellulase, Amylase, Pectinase, Protéase et Inulinase) pour en déterminer les souches les plus performantes. La production d'enzymes hydrolytiques par les souches a montré une diversité au sein de la même espèce selon les sites d'isolements. Certains genres possèdent même plusieurs activités hydrolytiques. Les activités d'inulinase, de cellulase, de pectinase, d'amylase et de protéase ont été exprimées par de nombreuses souches appartenant à plusieurs genres différents. Le criblage quantitatif des activités enzymatiques a montré que les souches halotolérants et légèrement halophiles ont présenté les activités enzymatiques les plus élevées par rapport aux bactéries halophiles modérées et extrêmes. Sur la base du criblage quantitatif et qualitatif de toutes les souches dotées d'activité cellulase et CMCase, certaines souches, les plus performantes, ont fait l'objet d'une recherche plus approfondie, notamment sur la caractérisation et production de cellulase. Ce qui a mené à identifier une souche productrice de cellulase en conditions minima de substrat. L'extrait protéique brut montre la capacité et caractéristiques intéressantes.

La première partie de ce présent travail est consacrée à la description des données relatives aux environnements hypersalins, aux micro-organismes halophiles et aux enzymes hydrolytiques et leurs applications en biotechnologie. La deuxième partie, s'est focalisée sur l'étude des sites d'isolement et leurs biodiversités microbiennes. Le criblage des activités recherchées et leurs dosages font l'objet de la troisième partie de ce travail. Pour finir, la quatrième partie a ciblé tous les tests relatifs à l'étude de cellulase à caractère halophile, suivie d'une conclusion générale qui a mis en évidence les perspectives de cette recherche.

Chapitre 1 :

Etude Bibliographique

Edgar Morin dit : « La connaissance est une navigation dans un océan d'incertitudes à travers des archipels de certitudes.». Cette étude bibliographique se veut donc une introduction générale de toutes les composantes de cette thèse, pour y encrer quelques archipels.

1. Les écosystèmes extrêmes

1.1. Notion d'environnements extrêmes

Un environnement, dans sa définition le plus générale, est un ensemble d'éléments, physique et chimique, qui sont soit biotiques soit abiotiques, dans lequel l'organisme se développe et vit. Un environnement « normal » est donc un espace avec de nombreux facteurs limitants. La loi de tolérance énoncée par Shelford (1911) stipule que tous les facteurs de l'environnement existent dans un intervalle de tolérance (la loi de la tolérance), dans lequel le processus écologique s'effectue normalement, à la borne inférieure, la mort par carence et à la borne supérieure, la mort par toxicité. Dès lors que l'un ou plusieurs facteurs dépassent ces limites, on parle d'environnement extrême.

Les premiers organismes extrêmophiles connus sont des halophiles ("qui aiment le sel"), découverts dans des environnements que beaucoup croyaient dépourvus de vie, comme la Mer Morte. Dès que l'on a découvert que la vie existe dans de tels écosystèmes extrêmes, les recherches se sont appliquées à délimiter et à classer les intervalles qui caractérisent de tels environnements. Kristjansson et Hreggvidsson (1995) ont débuté la classification des principaux environnements extrêmes naturels, caractérisés par une température élevée ou très faible, des pH bas ou élevés et une salinité élevée, pouvant être colonisés par des micro-organismes (Tableau 1). Les environnements divers comme : les sources chaudes alcalines, les champs acides de solfatares, et, les sols alcalins, les lacs de soude et les lacs hypersalins.

Tableau 1. Les principales caractéristiques des environnements extrêmes les plus étudiés. (Kristjansson & Hreggvidsson, 1995).

Habitat	Température (°C)	pH	Salinité (g/l)
Eau douce alcaline de sources chaudes	>60	>7	<60
Champs acides solfatares	>60	<3	<60
Les boues anaérobies et les sols géothermiques	>60	5 à 7	<60
Zones acides riches en soufre et pyrite	<50	<3	<60
Milieux alcalins carbonatés	<50	>8	<60
Les lacs de soude	<50	>9	>100
les lacs hypersalins	<50	5 à 8	>100

1.2. Environnements salins et hypersalins

Les environnements hypersalins sont essentiellement caractérisés et répertoriés selon leurs concentration totale en sels mais la composition ionique, différente pour chacun, est un facteur clé pour déterminer le biotope de l'environnement (Oren, 2006). Les sels sont des composés ioniques de cations et d'anions formant un produit neutre et sans charge nette. Ces ions peuvent être minéraux (Cl^- , Ca^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Mg^{2+}, K^+ , Na^+ , Li^+ , etc) ou organiques (acétate, carbonate, citrate, nitrate) ainsi que monoatomiques (F^-) ou polyatomiques (SO_4^{2-}). Dans le cas des environnements hypersalins, le termes

sel est utilisé pour définir une combinaison de différents anions et cations inorganiques parmi lesquels Cl^- et Na^+ sont les plus abondants.

On considère qu'un environnement est hypersalin quand la concentration en sels est supérieure à celle de l'eau de mer, qui est d'environ 35 g/l. Cependant, la notion d'hypersalinité peut faire référence à des concentrations salines bien plus élevées, parfois même proches des conditions de saturation. La solubilité du sel dans l'eau à 20°C est d'environ 360 g/L. Les environnements hypersalins sont nombreux et très répandus sur notre planète puisqu'on en retrouve sur les cinq continents. Le plus souvent, on fait la différence entre deux types de milieux hypersalins, les environnements thalassohalins et athalassohalins, qui diffèrent selon leur composition ionique.

1.2.1. Eaux salées

L'eau, la source de vie, celle qui a donné à notre planète son appellation de planète bleue dont ¾ de surface sont recouvertes par de l'eau. Mais seulement 3% de cette eau est douce, le reste représentent de l'eau salée (océans, mers et lacs).

Une eau est considérée non saline quand la conductivité électrique (EC) est inférieure à 0.7 dS/m (Ayers & Westcot, 1985). Cependant pour une bonne classification, on doit aussi prendre en compte l'origine, le type et la proportion de sel dans cette eau (tableau 2).

Tableau 2. Classification de l'eau saline selon Rhoades et *al.*, 1992.

Classification de l'eau		Conductivité électrique (dS/m)	Concentration en sels totaux (g/l)
1.	**Non saline**	< 0.7	< 0.5
2.	**Légérement saline**	0.7 – 2.0	0.5 – 1.5
3.	**Modérement saline**	2.0 – 10.0	1.5 – 7.0
4.	**Fortement saline**	10.0- 20.5	7.0 – 15.0
5.	**Très fortement saline**	20 .0 – 45.0	15.0 – 35.0
6.	**Saumure (Brine)**	> 45.0	> 35.0

Les environnements aquatiques salins et hypersalins, qui abritent une grande diversité de micro-organismes halophiles, ont plusieurs origines. Le plus connu des sites hypersalins est sans nul doute la mer Morte, issue d'un isolement tectonique ayant subi une salinisation progressive. Le lac Natron, au nord de la Tanzanie, résulte d'une dépression du grand rift africain. On retrouve selon ce principe deux types d'environnement aquatique hypersalins.

- **Environnements thalassohalins :**

Les systèmes thalassohalins sont similaires aux habitats marins. Ils sont chimiquement caractérisés par la prédominance des ions monovalents Cl^- et Na^+, bien que d'autres ions puissent être présents. Ce sont, le plus souvent, des lacs salés qui résultent de l'eau de mer et qui sont sujets à une évaporation continue et importante, comme le grand lac Utah (USA). L'exemple typique qui représente d'excellents modèles pour l'étude de micro-organismes vivant dans des conditions extrêmes sont les

salines d'évaporation solaire, aussi nommées salaisons solaires, utilisées pour la production de sel par évaporation de l'eau de mer ou d'eau salée.

- **Environnements athalassohalins :**

La composition ionique des environnements athalassohaline contraste fortement avec celle des milieux marins. Ces environnements ont des compositions dépendamment de leurs géologies, typologies et conditions météorologiques environnante. Les dépôts de sel qui forment avec le temps des évaporites proviennent de l'évaporation complète de l'eau de mer. Ils représentent un environnement fossile hypersalin. Leur dissolution par l'eau crée de nouveaux milieux athalassohalins.

1.2.2. Sols salins

Les sols salins ou sols salsodiques couvrent une surface importante du globe terrestre. Il y a deux origines à la salinisation des sols : la salinisation primaire qui est naturelle et qui représente 80% des cas, et la salinisation secondaire d'origine anthropique qui est due à l'irrigation. Selon l'origine de la salinisation du sol, on retrouve certains sels solubles en excès dans les sols salins, tels que : le potassium, le magnésium, le chlorure, le calcium, le sulfate, le carbonate, le sodium et le bicarbonate. En fonction de leurs compositions et de leurs teneurs en sels solubles, on peut distinguer entre sols thalassohalins et athalassohalins, bien que cette catégorisation ne soit pas aussi probante que pour les milieux aquatiques, vu le changement de composition, l'hétérogénéité et la structure même des sols.

C'est pourquoi les sols salés ou sols halomorphes sont le plus fréquemment caractérisés grâce à la conductivité électrique qui est l'index le plus utilisé pour évaluer la salinité d'un sol. En fonction de la salinité, quatre classes de sols salins ont été définies (Tableau 3) selon les standards de l'United States Salinity Laboratory Staff (USSLS) publié par Richards (1954).

Tableau 3. Répartition des sols en fonction de la conductivité électrique (EC) et de la teneur totale en sels.

Classification du sol par 'USDA*'	Appellation	Conductivité éléctrique (dS/m)	Concentration en sels accumulés (g/l)
0	non salé	0 – 2.0	< 1.5
1	Légèrement salé	2.0 – 8.0	1.5 –3.5
2	Modérément salé	8.0 – 15.0	3.5 – 6.5
3	Fortement salé	>15	>6.5

2. Les bactéries halophiles

2.1. Notion de micro-organismes extrêmophiles

Quand un organisme ou micro-organisme est retrouvé dans un environnement extrême, on l'appelle « extrêmophile », c'est-à-dire qu'il prospère dans des environnements dont les paramètres physico-chimiques tels que la température, la salinité, le pH ou la pression sont considérés comme hostiles à tout autre forme de vie. Une grande partie de ces extrêmophiles appartiennent au royaume des

archées (ou Archaea), suivis des bactéries. Parmi les micro-organismes qualifiés d'extrêmophiles, on rencontre ceux qui vivent en présence de fortes concentrations de sel (halophiles), ceux qui se développent à des températures froides ou chaudes (psychrophiles et thermophiles), et/ou dans des milieux très acides ou basiques (acidophiles et alcalophiles) ou sous pression élevées (piézophiles). On peut aussi avoir des micro-organismes poly-extrêmophiles. La notion d'extrêmophilie est différente de celle de la résistance aux conditions extrêmes.

2.2. Notion de micro-organismes halophiles

Sémantiquement, le mot halophile vient du grec *halos* "sel" et *phile* "aimer". Le micro-organisme halophile fut le premier de tous les extrêmophiles à avoir été découvert sur les rives de la Mer Morte en 1936 par Benjamin Elazari Volcani (Oren & Ventosa 1999). En découle l'impressionnante étude de Larsen « The halo bacteria's confusion to biology » apparue en 1973 (Larsen, 1973). Depuis, de nombreux chercheurs se sont attelés à mieux comprendre leurs fonctionnements, leurs modes d'adaptation et leurs classements.

2.3. Les types et catégories de bactéries halophiles

De nombreuses définitions ont été données dans la littérature pour qualifier les termess halotolérant et halophile. Elles sont basées sur la réponse de la croissance des micro-organismes en présence de NaCl. Mais les limites qui définissent l'halophilisme et l'halotolérance peuvent changer par l'effet de nombreux facteurs comme la température, la concentration et la présence de certains nutriments, et ou la présence d'autres sels, qui modifient considérablement la réponse des bactéries au NaCl. En général, le termes « halophile » désigne les micro-organismes nécessitant la présence de sel (NaCl) dans le milieu pour leur croissance. En 1962, Larsen a défini 3 catégories de bactéries halophiles selon la concentration en sel à laquelle une croissance est optimale. Et en 1973, a établi la première classification. Kushner & Kamekura (1988) ont affiné la classification des halophiles, surtout des halophiles extrêmes. Oren (2006) a, quant à lui, revisité cette classification. Ventosa & Arahal ont établit en 2009 la plus récente des classifications (Tableau 4).

Tableau 4. Classification des bactéries halophiles selon Larsen, Kushner, Oren et Ventosa.

	Classification de Larsen	**Classification de Kushner**	**Classification d'Oren**	**Classification de Ventosa**
Catégorie	NaCl (%)			
Non halophiles	< 2%	< 1%	>1.2%	<1%
Legèrement halophiles	2 à 5%	1 à 3%	1.2 à 2.9 %	1 à 3%
Halophiles modérées	5 à 20%	3 à 15%	2.9 à 14.6%	3 à 15%
Halophiles extrêmes	20 à 30%	15 à 23% au bord de l'extrême et 24 à 36% extrême	8.8 à 23.4% Extrême limite et 14.6% à 53.04% Extrême	> 15%

En revanche, le termes « halotolérant » signifie que les micro-organismes tolèrent différentes concentrations en sel durant leur croissance, qui est meilleure dans des milieux contenant une concentration de sel <0.2 M (±1.0 % (p/v)). Les bactéries nécessitant moins de 1% (p/v) de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérées comme halophiles.

Tableau 5. Classification des bactéries halotolérantes (Tiquia et *al.*, 2007).

Catégories	Concentration maximum de NaCl (%)
Légèrement halotolérantes	6 à 8%
Modérément halotolérantes	18 à 20%
Extrêmement halotolérantes	0 à 30%

2.4. Adaptation des micro-organismes halophiles

Pour contrer la force ionique, la pression osmotique et le stress hydrique (causé par la forte concentration en sel de leurs environnements qui peut atteindre une concentration supérieure à 5 M), ont provoqué plusieurs mécanismes d'adaptations chez les micro-organismes. Comme les membranes biologiques sont perméables à l'eau, tous les micro-organismes doivent maintenir leur cytoplasme au moins iso-osmotique avec leur environnement (Oren, 1999). Deux principaux mécanismes d'osmorégulation sont adoptés par les halophiles. Le premier consiste en l'accumulation d'ions inorganiques (Na^+, K^+, Cl^-) dans le cytoplasme, dénommée stratégie « salt-in ». Le deuxième consiste en la biosynthèse et/ou l'accumulation de solutés organiques dans le cytoplasme qualifié de statégie **«** osmolyte **»** (Siglioccolo et *al.*, 2011).

2.4.1. La stratégie « Salt-in » ou d'accumulation d'ions inorganiques

Cette stratégie a été découverte pour la première fois chez les *Halobacteria*, et est considérée comme la stratégie typique des Archaea en ce qui concerne l'osmoadaptation.

La cellule s'ajuste thermodynamiquement en augmentant la concentration en sel dans le cytoplasme. Ceci implique l'accumulation des ions K^+ et Cl^- pour maintenir l'équilibre osmotique. C'est le principal mécanisme utilisé par les archaebactéries halophiles extrêmes dont le KCl intervient en tant qu'agent osmorégulateur. Il s'accumule à l'intérieur de la cellule pour empêcher la sortie de l'eau vers le compartiment extracellulaire.

Cependant, la concentration intracellulaire élevée de KCl (100 fois supérieure à celle de l'environnement extérieur) exige une adaptation supplémentaire des machineries enzymatiques, et des protéines, pour maintenir leur activité et leurs conformations appropriées en accumulant un excès des acides aminés acides (Eisenberg & Wachtel 1987). Les enzymes intracellulaires exigent pour leur fonctionnement des taux élevés en KCl et sont dénaturées lorsque les teneurs en sel diminuent dans le milieu (Grant et *al.*, 2001). Les sous unités fonctionnelles et structurales des cellules sont également adaptées à des hautes concentrations en sels.

2.4.2. La stratégie « osmolyte » d'accumulation d'ions organiques ou solutés compatibles

Cette stratégie est répandue chez les bactéries, les eucaryotes et certaines Archaea méthanogènes (Lai & Gunsalus 1992). L'organisme garde une conception cellulaire intérieure intacte et une grande partie du cytoplasme ne contient pas de NaCl. La réduction du potentiel chimique de l'eau dans la cellule est due à l'accumulation de solutés organiques non chargés et très solubles dans l'eau. Les solutés compatibles regroupent des molécules de structures très diverses : acides aminés, sucres (tréhalose, sucrose), phosphodiesters, et glycérates (Empadinhas & Da Costa 2008). Les phosphodiesters et les glycérates sont des solutés chargés (Figure 1) alors que les autres sont neutres ou zwittérioniques. Parmi les acides aminés et dérivés, seuls un petit nombre a un rôle de soluté compatible : glutamine, glutamate, lysine (chez les méthanogènes), proline, glycine bétaïne, ectoïne et hydroxyectoïne chez de nombreuses halophiles. Le tréhalose et le sucrose sont des osmolytes très répandus chez les bactéries et les Archaea jusqu'aux invertébrés. Ils jouent également un rôle important chez certaines espèces halothermophiles.

Ces composés sont synthétisés par l'organisme ou importés de l'environnement externe sans interférer avec son métabolisme. Les propriétés des solutés compatibles suggèrent qu'il serait possible de les utiliser en biotechnologie pour protéger des macromolécules ou des cellules soumises à des conditions de stress. Ces composés sont regroupés sous l'appellation d'extrêmolytes (Lentzen & Schwarz, 2006).

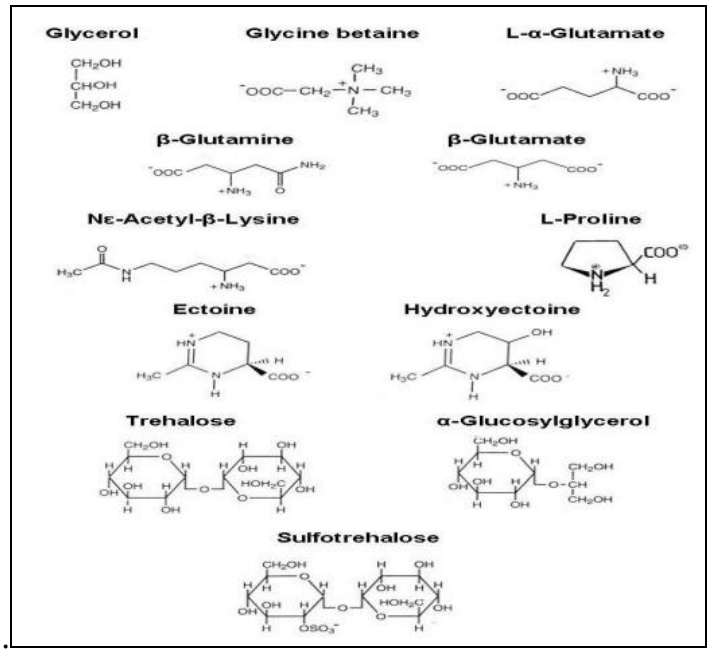


Figure 1. Quelques solutés compatibles utilisés par les Archaea pour l'osmoadaptation (Oren, 2008).

2.5. Biodiversité de micro-organismes halophiles

Les halophiles et les halotolérants présentent une grande diversité phylogénétique. On les trouve parmi les trois domaines du vivant : *Archaea, Bacteria et Eucary* (Oren, 2002). La Figure 2 montre la distribution d'organisme halophile et halotolérant dans les trois domaines du vivant.

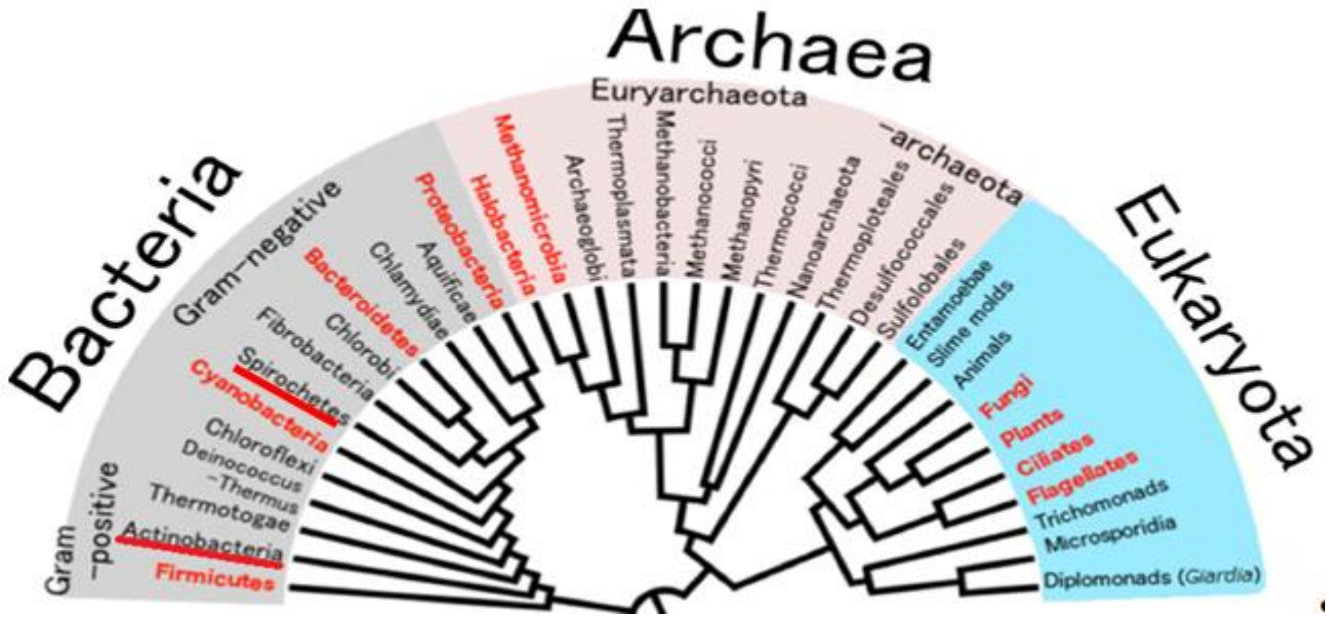


Figure 2. Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative des séquences de l'ARNr 16S et la distribution des halophiles. *En rouge les groupes contenant au moins un halophile (Edbeib et al., 2016).*

2.5.1. Domaine des *Archaea*

Dans des environnements hypersalins, les *Archaea* halophiles de la famille des *Halobacteriaceae* de l'ordre des *Halobacteriales*, représentent la composante principale de la biomasse microbienne. La famille des *Halobacteriaceae* est formée de 43 genres, qui sont pour la plupart aérobies, et les environnements où on retrouve de telles espèces, ont une coloration rose ou rougeâtre dûe aux pigments caroténoïdes présents dans la cellule et qui est caractéristique de cette famille (Oren, 1994). Certains *Halobacteriales* sont anaérobies et photohétérotrophes. *Halococcus*, la première archée décrite en 1880 par Farlow.

2.5.2. Domaine des Bacteria

Le domaine *Bacteria* forme un groupe phylogénétique très hétérogène avec une multitude de bactéries halophiles et halotolérantes, inclus dans 6 phyla: *Proteobacteria*, *Firmicutes, Actinobacteria*, *Spirochaete, Cyanobacteria* et *Bacteroidetes* (Oren 2011).

2.5.2.1. Phylum *Proteobacteria*

Le phylum *Proteobacteria* contient cinq classes de bactéries à Gram négatifs: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* (ou *Deltabacteria*) et *Epsilonproteobacteria* (Brenner et *al.*, 2005). Les différentes branches des protéobactéries contiennent des représentants halophiles. La famille des *Halomonadaceae,* de la classe *Gammaproteobacteria* contient le nombre le plus important d'espèces halophiles modérées et extrêmes, comme le genre *Halomonas* qui a été isolé pour la première fois d'un marais salants de l'île de Bonaire dans les Antilles néerlandaises (Vreeland et *al.*, 1980). Le genre *Shewanella* comprend lui aussi plusieurs espèces halotolérantes mais aussi strictement halophiles : *S. amazonensis, S. benthica, S. colwelliana, S. gelidimarina, S. hanedai, S. violacea et S. woodyi* (Bowman, 2015).

2.5.2.2. Phylum Firmicutes

Le phylum *Firmicutes* contient des membres divers aux niveaux morphologique et physiologique et sont capables d'habiter une grande variété d'environnements, tels que les habitats hypersalins. La classe *Bacilli* et *Clostridia* contiennent des familles avec des membres strictement halophiles, notamment (i) la famille des *Bacillaceae* dont la majorité de ses genres est strictement halophile comme *Halobacillus et Exiguobacterium* (Ludwig *et al*., 2008, Raichand et *al.,* 2012) ; (ii) La famille des *Planococcaceae* avec entre autres les genres *Planomicrobium*, *Planococcus* et *Jeotgalibacillus* (Yoon et *al.*, 2015 ; Waghmode et *al.*, 2019 ; Yaakop et *al.*, 2015) et (iii) la famille des *Staphylococcaceae*, avec les genres *Staphylococcus, Jeotgalicoccus* et *Salinicoccus* (Conde-Martinez, 2017 ; Yoon et *al.*, 2003 ; Ventosa et *al.*, 1990). L'ordre des *Halanaerobiales* est composé de deux familles, les *Halanaerobiaceae* et les *Halobacteroidaceae*, qui sont uniquement anaérobies halophiles (Oren 2001).

Le genre *Bacillus* halophile et halotolérant est largement réparti dans différents environnements salins et hypersalins et est caractérisé par une croissance optimale dans un milieu contenant 3 à 15% (p/v) de NaCl (Ventosa et *al.*, 1998). Les représentants du genre *Bacillus* sont isolés dans toutes les catégories d'halophilie, Chen et *al.*, en 2011 a isolé *Bacillus xiaoxiensis,* une espèce légèrement halophile dans le sol non salin de la réserve national naturelles Xiaoxi en Chine. Dans la catégorie des halophiles modérés, une *Bacillus polygoni* a été isolée de boules d'indigo au Japon ou encore une *Bacillus persepolensis* isolée du Lac hypersalin Howz-Soltan en Iran (Aino et *al.,* 2008 ; Amoozegar et *al.,* 2009). De nombreux *Bacillus* halotolérants ont aussi été décrits, comme *Bacillus luteolus* et *Bacillus ligniniphilus* (Shi et *al.,* 2011 ; Zhu et *al* ., 2014).

2.5.2.3. Phylum Actinobacteria

On retrouve les halophiles et halotolérants dans les sous-classes des *Actinobacteridae*, dans l'ordre *Actinomycetales*. Gochnauer a, en 1975, isolé et identifié la première souche d'actinobactérie halophile extrême à partir de la contamination d'une culture d'halobactérie qui fut nommée *Actinopolyspora halophila*. Depuis cette date, une diversité phylogénique des actinobactéries halophiles a été décrite et classée dans diverses familles et divers genres. On peut citer par exemple les espèces halophiles du genre *Haloglycomyces* (Guan et *al.,* 2009) et *Haloactin* et parmi les espèces halotolérantes, on peut citer les genres *Brevibacterium* et *Sanguibacter* (Trujillo & Goodfellow, 2015 ; Cortes-Tolalpa et *al.*, 2018).

2.5.2.4. Phylum Spirochaete

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

2.5.2.5. Phylum Cyanobacteria

Ce phylum est connu pour ces algues et bactéries bleu-vert. On les retrouve dans de nombreux environnements aquatiques marins et hypersalins. Il n'y a que très peu de taxons cyanobactériens qui ont

été considérés comme valablement décrits, il n'y a donc que 6 genres valides : *Halospirulina, Planktothricoides, Prochlorococcus, Prochloron, Prochlorothrix* et *Rubidibacter* (Oren, 2004). Parmi les espèces halophiles de cyanobactéries, *Halospirulina tapeticola* est considérée comme faiblement halophile (Nubel et *al.*, 2000).

2.5.2.6. Phylum Bacteroidetes

Ce phylum se compose de trois classes : *Bacteroidia*, *Flavobacteria* et *Shingobacteria*. Ces dernières incluent des espèces halophiles faibles et modérées et quelques espèces halophiles extrêmes aérobies et pigmentées: *Salinibacter ruber* (Anton et *al.*, 2002), *Salisaeta longa* (Vaisman & Oren, 2009) et *Salinibacter iranicus, Salinibacter luteum* (Makhdoumi-Kakhki et *al.*, 2012).

2.6. Le potentiel biotechnologique des halophiles

La biotechnologie est face à de nombreux défis, tant économique qu'écologique. Les halophiles ont démontré au fil de ces dernières décennies un fort potentiel pour surmonter ces défis mais aussi des capacités uniques exploitables dans diverses industries (Liu et *al.*, 2019).

2.6.1. Les enzymes

Ces dernières années, la recherche d'enzymes performantes booste les chercheurs. Des investigations, pour rechercher des biocatalyseurs qui peuvent faire face aux conditions extrêmes des processus industriels, ont augmenté. Les biocatalyseurs ont souvent une meilleure précision chimique, qui peut mener à une production plus efficace de stéréoisomères simples, diminuant le nombre de réactions secondaires, et avec un impact inférieur sur l'environnement. En dépit d'un grand nombre d'enzymes qui ont été appliquées dans divers processus biotechnologiques et industriels, la demande des biocatalyseurs plus efficaces est importante (Arnold, 2001). Selon des études de marché sur les enzymes, le marché mondial des enzymes devrait enregistrer un taux de croissance annuel d'environ 7.8% au cours de la période 2015-2020 et atteindre 6.3 milliard de dollars (Global Indutrial Enzyme Market Report, 2014).

Les producteurs halophiles d'hydrolases sont pour la plupart de la famille des *Halomonadaceae.* Mais il est observé que ce sont les bactéries modérément halophiles et Gram positifs qui ont une plus grande activité hydrolytique (Rohban et *al.*, 2009 ; Johnson et *al.*, 2017). Cela peut s'expliquer par le métabolisme plus « versatile » des bactéries halophiles.

2.6.2. Solutés compatibles

Les solutés compatibles des halophiles ont trouvé très facilement leur chemin vers l'industrie et sont largement utilisés dans les industries cosmétiques et alimentaires comme des hydratants et des conservateurs.

2.6.2.1. L'ectoïne

L'ectoïne (l'acide1,4,5,6-tétrahydro-2-méthyle-4-pyrimidinecarboxylique) est l'un des solutés osmotiques les plus répandus. Ce soluté a été détecté pour la première fois chez *Halorhodospora halochloris* (Galinski et *al.*, 1985). L'ectoïne est aussi produit par *Brevibacterium epidermis, Bacillus*

halodurans (José et *al.,* 2010). L'ectoïne est principalement utilisé comme stabilisant de protéines et d'autres macromolécules, mais aussi pour protéger la peau des altérations causées par les rayons ultra violets, ce qui lui a valu d'être ajouté à certaines crèmes hydratantes (Rabe et *al.,* 2006).

2.6.2.2. Le β-carotène

Le β-carotène est à la base du succès des halophiles dans le domaine de la biotechnologie. Il est produit par *Dunaliella salina* et *Dunaliella bardawil* (Ben-Amotz et Fishler 1998) et récemment par *Haloferax volcanii* (Haque et *al.,* 2020). Le β-carotène est un pigment très demandé en tant qu'antioxydant, source de la provitamine A (rétinol) ou agent de coloration d'aliments.

2.6.3. Production de bio-polymères

2.6.3.1. Les exopolysaccharides (EPS)

En milieu marin, la production de polysaccharides bactériens semble être majoritairement trouvée dans des souches appartenant aux genres *Alteromonas, Pseudomonas, Pseudoalteromonas, Shewanella* et *Vibrio* (Nazarenko et *al.,* 2003). Dans la nature, ces exopolysaccharides remplissent plusieurs fonctions : celle de barrière physique favorisant la lutte contre la phagocytose ou celle d'assurer la fixation irréversible des micro-organismes sur les surfaces exposées en milieu naturel en favorisant la formation d'un voile biologique ou biofilm (Flemming & Wingender 2001).

2.6.3.2. Les polyhydroxyalcanoates (PHA)

Les propriétés physico-chimiques des PHA dépendent de leur composition chimique, elle-même influencée par la nature de la source carbonée utilisée pour la croissance des bactéries et la synthèse de PHA. Ce qui offre une large gamme de produits couvrant de nombreux domaines d'application : l'environnement (emballages biodégradables, films...), les produits d'hygiène, l'agriculture et l'horticulture, la chimie (synthèse, adhésifs, résines, encres...), la cosmétologie, l'industrie automobile et le secteur médical, notamment en tant que biomatériaux utilisés pour la réalisation de sutures, de prothèses, ou la synthèse de nouveaux médicaments et pour la délivrance contrôlée de médicaments et de produits actifs (Hazer & Steinbüchel 2007). Ce type de biopolymères a été notamment synthétisé à partir d'une archée *Haloferax mediterranei* (Huang et *al.,* 2006) et d'*Halomonas boliviensis* (Quillaguaman et *al.,* 2006) mais aussi de *Haloarcula, Haloferax, Halococcus, Haloquadratum, Halobacterium, Haloterrigena* et *Natronobacterium* (Haque et *al.,* 2020).

2.6.4. Bactériorhodopsine

Découverte au début des années 70 et produite par *Halobacterium salinarum* (Marwan & Oesterhelt 1991), c'est une protéine qui représente un modèle pour l'étude de la bioénergétique et pour le transport membranaire. Cette protéine est utile dans la fabrication de biopuces, et est utilisée dans l'industrie du stockage de données. L'emploi de la bactériorhodopsine constitue l'une des premières applications de l'électronique moléculaire organique, une discipline émergente de la nano-informatique.

2.6.5. Production de sel

L'obtention du sel se fait depuis l'Antiquité dans des marais salants. A l'époque, on extrayait des sainerie (ou saulnerie) le sel de l'eau de mer par évaporation naturelle ou accélération grâce à des fours à sel. Depuis, la technique n'a pas changé, on recrée le même processus dans les marais salants mais on sait maintenant que quand la saumure s'approche de la saturation et que le sel commence à se cristalliser. Les eaux salines deviennent colorées en rouge car cela est dû aux communautés planctoniques des micro-organismes rouges dans les étangs de cristallisation, généralement considérées bénéfiques au procédé de la production de sel. Les pigments de caroténoïdes absorbent l'énergie lumineuse, ce qui augmente la température de l'eau, permettant un taux accru d'évaporation. Des études réalisées ont montré l'implication des Archaea halophiles dans la cristallisation de l'halite (Davis & Giordano 1996).

2.6.6. Fermentation des aliments

L'application de bactéries halophiles en agroalimentaire a été traditionnellement utilisée dans la production de certaines sauces à poissons et sauce de soja. Cette fermentation implique l'activité d'hydrolases, d'isomérases et de protéases de divers micro-organismes halophiles ou fortement halotolérants (Oren 2002). Souvent, dans les aliments fermentés, on retrouve des Archaea halophiles (Lee, 2013), mais aussi certaines bactéries halophiles, comme *Halobacillus, Halomonas* et *Lentibacillus* (Lopetcharat et *al.,* 2001).

2.6.7. Traitement des eaux usées

Ces dernières années, la pollution des eaux est devenue l'un des problèmes environnementaux les plus graves. En parallèle, on estime que 5.0 % des effluents industriels mondiaux générés par les industries agroalimentaires, du pétrole et du cuir, sont salins ou hypersalins (Le Borgne et *al.,* 2008) et ont une teneur en matière organique élevée.

Les bactéries halophiles sont aptes à être utilisées en bioremédiation en cas de contamination par divers produits chimiques, métaux lourds, radionucléides ou composés halogénés. Ainsi, dès les années 90, des bactéries halophiles ont été étudiées pour la bioremédiation des eaux usées de l'industrie pétrolière, telles que *Halomonas* spp. (Hinteregger & Streichsbier 1997), et *Halobacterium sp*. (Dinçer & Kargi 2001) qui peuvent dégrader les n-alcanes à chaîne carbonée à des teneurs de 30% en NaCl, mais aussi *Haloferax mediterranei* (Djeridi et *al.,* 2013). Un consortium bactérien composé de *Marinobacter spp., Erwinia ananas, Bacillus spp.* a été construit et a été capable de dégrader les hydrocarbures (Díaz et *al.,* 2000). Pour la bioremédiation des effluents de l'industrie textile, une *Halobacillus* sp. C-22, isolée de marais salants en Turquie, s'est avérée résistante aux colorants toxiques présents dans ces eaux usées (Demirci et *al.,* 2011). Une autre étude a démontré la capacité de souches bactériennes halo-alcalophiles du genre *Pseudomonas* à dégrader le BTEX (= Benzène, Toluène, Ethylbenzène et le xylènse) d'effluents synthétiques salins (Hassan & Aly, 2017).

3. Les enzymes : généralités

Les enzymes, ou catalyseurs, sont des protéines qui existent chez les êtres vivants afin de faciliter les réactions qui se déroulent dans les cellules. L'utilisation d'enzymes remonte aux civilisations orientales, qui étaient capables de produire de la bière et différents alcools à base de fruits et grains fermentés et cela 3000 ans avant Jésus Christ. Mais le termes « enzyme » a été utilisé pour la première fois par Wilhelm Kühne, physiologiste allemand, en 1878 pour décrire la production d'alcool par les levures (Robinson, 2015), d'où son nom qui vient du grec *en* (dedans) et *zume* (levure). Il y a plusieurs catégories d'enzymes, les oxydoréductases qui catalysent les réactions d'oxydation/réduction, les transférases qui transfèrent un groupement fonctionnel, les lyases qui scindent diverses liaisons, les isomérases qui catalysent les réactions d'isomération au sein d'une molécule simple, les ligases qui joignent deux molécules par liaison covalente et les hydrolases qui catalysent l'hydrolyse de diverses liaisons.

3.1. Notion d'extrêmozyme

Cette notion d'extrêmozyme est apparue et reconnu pour la première fois grâce au succès de la PCR (*polymerase chain reaction*), une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique qui permet d'amplifier une séquence d'ADN connue grâce à la Taq polymérase issue d'une bactérie thermophile *Thermus aquaticus* isolée en 1969 (Chien et *al.,* 1976). D'autres ADN polymérases sont isolées de *Pyrococcus furiosus* (Pfu polymérase) et *Thermococcus litoralis* (Tli polymérase) (Kim et *al.,* 2008 ; Cariello et *al.,* 1991).

Les thermophiles ont donc démontré les nombreux avantages de l'utilisation d'extrêmozymes, comme leurs fonctionnalités à des températures élevées, qui mène à une augmentation de la solubilité des substrats, à la diminution de la viscosité, aux vitesses de transfert et de réaction plus élevées (Ferrera & Reysenbach 2007).

Les extrêmozymes des bactéries et des Archaea thermophiles et alcalophiles sont largement utilisés. Ce qui contraste avec la faible utilisation d'enzymes halophiles, appelés haloenzymes, qui n'ont jusqu'ici trouvé que très peu d'applications en industrie et en biotechnologie. Une haloenzyme est une enzyme qui est inactive en absence de sel. Malgré cela, les enzymes de micro-organismes halophiles sont de plus en plus étudiées pour leur activité dans des environnements avec peu d'eau.

3.2. Base moléculaire de l'osmoadaptation des haloenzymes

La fonction d'une enzyme est conditionnée par sa structure tertiaire, qui est elle-même dépendante des interactions avec les molécules d'eau présentes à leurs surfaces. C'est pourquoi une enzyme « normale » précipite dans un environnement ou une solution saline proche de la saturation. Les molécules d'eau ne peuvent plus interagir avec les acides aminés présents à la surface de la molécule parce qu'elles sont piégées par le sel. Ce qui déstabilise la conformation native de la protéine et la rend donc insoluble.

Il est bon de savoir que la première distinction que l'on peut faire entre les protéines halophiles et non halophiles est que les protéines halophiles concentrent à peu près 10% de leur poids en KCl au niveau de la surface pour y piéger les molécules d'eau nécessaires au maintien de leur structure et donc de leurs solubilité et de leur fonction. L'autre différence est la grande abondance d'acides aminés acides (acide glutamique et acide aspartique) situés en surface (Werber & Mevarech 1978), ce qui crée une charge négative résiduelle qui rivalise avec le sel pour l'hydratation de la cellule (Lanyi, 1974). Cela crée une sorte d'enveloppe d'hydratation renforcée qui constitue une sorte de couche autour de la protéine, capturant les molécules d'eau pour permettre à la protéine d'être toujours en contact avec des molécules H_2O.

3.3. Les enzymes hydrolytiques

3.3.1. Généralité

Une enzyme hydrolytique permet de briser les liaisons covalentes. Par exemple les estérases agissent sur les liaisons ester, les glycosidases agissent sur les oligo- et polysaccharides. Les enzymes décrites ci-dessous sont celles qui feront l'objet de notre étude de thèse, à savoir, les amylases, les cellulases, les inulinases, les pectinases et les protéases.

3.3.2. La biodiversité des halophiles producteurs d'enzymes hydrolytiques

Au cours des dernières années, différentes études ont été consacrées à l'isolement d'Archaea et de bactéries halophiles dans les environnements salins afin de caractériser de nouvelles activités enzymatiques. Ce qui a mené à la description de plusieurs hydrolases halophiles. L'étude de la biodiversité et de la production d'enzymes hydrolytiques peut être vue comme un criblage préliminaire qui mène, très souvent, à la découverte de nouveaux genres producteurs d'haloenzymes à fort potentiel industriel.

En 2018, Vijay et *al.,* ont élaboré un consortium de bactéries halophiles (*Bacillus sp., Staphylococcus sp.* et *Virgibacillus sp.)* isolées du Lac Sambha en Inde, capable de dégrader l'amidon à une concentration en NaCl de 3.0 M. En 2015, Yu & Li ont isolé du sol Yuncheng en Chine, une *Gracilibacillus* sp. SK1 produisant une cellulase active à 10% (~ 2.0 M) de NaCl. Une pectinase thermostable a été produite par une *Bacillus halodurans* M29 (Mei et *al.,* 2013). *Planococcus donghaensis* dont le génome a été complètement séquencé produit une pectinase (See-Too et *al.,* 2017). En 2014, Selim et *al.,* a reporté une protéase extracellulaire thermostable et halo-alcalophile produite par *Natronolimnobius innermongolicus* WN18 (HQ658997), isolée du Lac de An-Natrun en Egypte. Isolée de sédiments de l'estuaire du Vellar Parangipettai (Sud-est d'Inde), une *Bacillus cereus* produit une inulinase extracellulaire purifiée et caractérisée par Meenakshi et *al.* en 2013.

Les enzymes intracellulaires et extracellulaires des bactéries halophiles modérées et halotolérantes ont été plus intensément étudiées et donc caractérisées, contrairement à celles des halophiles extrêmes. Certaines enzymes ont trouvé un intérêt commercial considérable tel que la nucléase H produite par *Micrococcus varians subsp. Halophilus*, enzyme responsable de la production

d'agents de saveur (Kamekura et *al.,* 1982). Le tableau 6 présente une liste subjective et non exhaustive résumant quelques recherches sur la biodiversité de micro-organismes halophiles et sur les activités enzymatiques testées lors des études dans diverses biotopes hypersalins, à travers le monde. Il existe une grande diversité taxonomique de micro-organismes dotés d'une activité hydrolytique. Selon la bibliographie et les études récentes, certains genres sont prédominants comme *Bacillus. C*eci peut être dû à la distribution aérienne des spores dans la plupart des habitats. Ce genre est bien connu en tant que producteur d'enzymes extracellulaires et de nombreux procédés industriels utilisent des espèces de ce genre pour la production commerciale d'enzymes.

Tableau 6. Micro-organismes producteurs d'enzymes hydrolytiques isolés de différents milieux hypersalins. *ND : Non Déterminé.*

Site d'isolement	Activité enzymatique	Genre reporté	Références
Marais salins d'Almeria, Cadiz et Huelva (Espagne)	Amylases, DNases, Lipases, Protéases, Pullulanases	*Salinivibrio, Halomonas, Chromohalobacter, Bacillus, Salibacillus, Salinicoccus, Marinococcus*	Sanchez-Porro et *al.,* 2003
Mine de sel Tuzkoy, centre d'Anatolia (Turquie)	Amylases, DNases, Gélatinases, Cellulasses, β-Galactosidases	*Halobacterium, Haloarcula, Natrinema, Halorubrum*	Birbir et *al.,* 2004
Lac Howz Soltan, désert central (Iran)	Lipases, Amylases, Protéases, Inulinases, Xylanases, Cellulases, Pullulanases, DNases, Pectinases	*Salicola, Halovibrio, Halomonas, Halobacillus, Oceanobacillus, Piscibacillus, Thalassobacillus, Virgibacillus, Gracilibacillus, Salinicoccus*	Rohban et *al.,* 2009
Mine de sel Unirea, Slanic Prahova (Roumanie)	Amylases, Gélatinase, Lipases, Caséinases, Cellulases, Xylanases	*ND*	Cojoc et *al.,* 2009
Lac hypersalin d'Aran-Bidgol, désert central (Iran)	DNases, Amylases, Lipases, Inulinases, Pullulanases, Protéases, Cellulases, Chitinases, Xylanases	*Halorubrum, Haloarcula, Natrinema, Halovivax, Natronomonas.*	Makhdoumi Kakhki et *al.,* 2011
Lac salin de Sambhar et côte de Kozhikode (Kerala), Goa, Nagoa (Diu), Somnath (Gujarat), Veraval (Gujarat) et Triveni Sangam (Gujarat). (Inde)	Amylases, Lipases, Protéases	*Marinobacter, Virgibacillus, Halobacillus, Geomicrobium, Chromohalobacter, Oceanobacillus, Bacillus, Halomonas, Staphylococcus*	Kumar et *al.,* 2012
Lac salin de Sehline Sebkha au Nord-Est (Tunisie)	Chitinases, Cellulases, Xylanases, Protéases, Curdlanases	*Haloferax, Natrinema, Halomonas, Pseudomonas, Halovibrio, Salicola, Marinococcus, Bacillus, Halobacillus, Gracilibacillus, Pontibacillus*	Hedi et *al.,* 2014
Chott Melghir (Biskra), Sebkha Ezzmoul (Ain M'lila), Sidi Ameur (Bousaâda), Chott Zahrez Gharbi (Djelfa), Sebkha ELGolea et Sebkha Adrar (Algérie)	Caséinases, Esterases, Amylases	*Natrinema, Natrialba, Haloarcula, Halopiger, Haloterrigena, Halorubrum, Halostagnicola, Natronococcus, Halogeometricum, Haloferax*	Quadri et *al.,* 2016
L'eau de mer des côtes de Yeosu, à l'Ouest de la province de Jeolla (Corée du Sud) et de KCTC (Korean Collection for Type Cultures, Daejeon, South Korea)	Protéases, Lipases, Amylases, Cellulases, Mannanases, Xylanases, Chitinases	*Exiguobacterium, Micrococcus, Halomonas, Thalassobacillus, Pseudoalteromonas, Marinobacterium, Marinovum, Marinobacter, Marinobacterium*	Johnson et *al.,* 2017

Des sites Ramsar : Chott Tinsilt (CTI), Chott El Beïdha–Hammam Essoukhna (CHS), Sebkha El Hamiet (SE), Sebkha Djendli (SDJ), Sebkha Medghacen (SMD), Sebkha Oumache (SOM) et Chott Kralla (KAR) (Algérie)	Estérases, Gélatinases, Inulinases, Cellulases, Protéases, Xylanases, Pectinases, Nucléases, Lipases, Amylases	*Haloarcula, Halococcus, Haloferax, Halogeometricum, Haloterrigena, Natrialba, Natrinema*	Menasria et *al.*, 2018
Sédiments marins de zones de marées, Pekin (Chine)	Protéases, Amylases, Lipases, Pectinases, Pullulanases, Xylanases, Cellulases	*Bacillus, Pontibacillus, Halobacillus, Planococcus, Staphylococcus, Virgibacillus, Exiguobacterium, Paenibacillus, Cobetia, Halomonas, Vibrio, Alteromonas, Photobacterium, Paracoccus*	Wei et *al.*, 2018

3.3.3. Conditions de production d'enzymes hydrolytiques par des bactéries halophiles

La fermentation devient la principale méthode de production d'enzyme en raison des nombreux avantages des enzymes d'origine microbiennes. Au cours de la fermentation, la production d'enzymes a été principalement réalisée par fermentation en milieu liquide, bien que la fermentation en milieu solide (SSF) gagne en pertinence ces dernières années (Flores-Gallegos et *al.*, 2019).

Plusieurs facteurs jouent un rôle primordial sur la croissance et la capacitée de produire des enzymes hydrolytiques. L'ajout de certains nutriments, le pH, la quantité et type de substrat et la température sont des paramètres largement étudiés pour tous les types de bactéries extrêmophiles. Pour les bactéries halophiles, la salinité est un autre paramètre obligatoire pour la croissance et production d'enzymes hydrolytiques. Selon le genre bactérien, la catégorie d'halophilisme et l'enzyme hydrolytique recherchée, plusieurs conditions différentes sont obtenues et décrites.

3.3.4. Amylases

3.3.4.1. Définitions

Les amylases (EC.3.2.1.x) sont des macromolécules appartenant à la classe des protéines de type endoglycanases de la classe des hydrolases qui agissent sur les liaisons (1,4) de l'amidon. Il y a α-amylase (ou α 1,4-glucan-4 glucanohydrolases, EC 3.2.1.1), β-amylase et glucoamylase (Glucan 1,4-α-glucosidase ou amyloglucosidase).

3.3.4.2. Mode d'action

En pratique, lors de la saccharification enzymatique de l'amidon, l'amylopectine, le gluco-oligosaccharide ramifié est la plus petite molécule produite en premier, pour ultimement donner des molécules de maltose (disaccharides de α-glucose). La dégradation de l'amidon par une amylase peut produire des dextrines et différents gluco-oligosaccharides. Les alpha-amylases sont spécifiques au clivage de la liaison interne α-1,4, donnant des maltodextrines et α-1,4,6 ramifiés des gluco-oligosaccharides à partir d'amidon (Lombard et *al.*, 2014). Les glucoamylases sont généralement actives sur les liaisons terminales α-1,4 donnant des monomères de glucose (Mojovic et *al.*, 2006). Mais ils peuvent aussi hydrolyser la liaison α-1,6, mais à un taux beaucoup plus bas par rapport aux autres

liaisons (Pazur & Ando 1960).

Selon leurs modes d'actions (Fig. 3), les glycosides hydrolases ou amylases sont classées selon Michelin et *al.*, (2010) et l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (UIBMB) en trois grands groupes :

- Les endoamylases qui hydrolysent des liaisons α-1,4 de l'amylose et de l'amylopectine, libérant des oligosaccharides et des dextrines.
- Les exoamylases qui regroupent la β-amylase, l'α-glucosidase et la glucoamylase, libérant des sucres de faibles poids moléculaires.
- Les enzymes débranchantes (pullulanase et isoamylase), qui hydrolysent les liaisons α-1,6 de l'amylopectine.

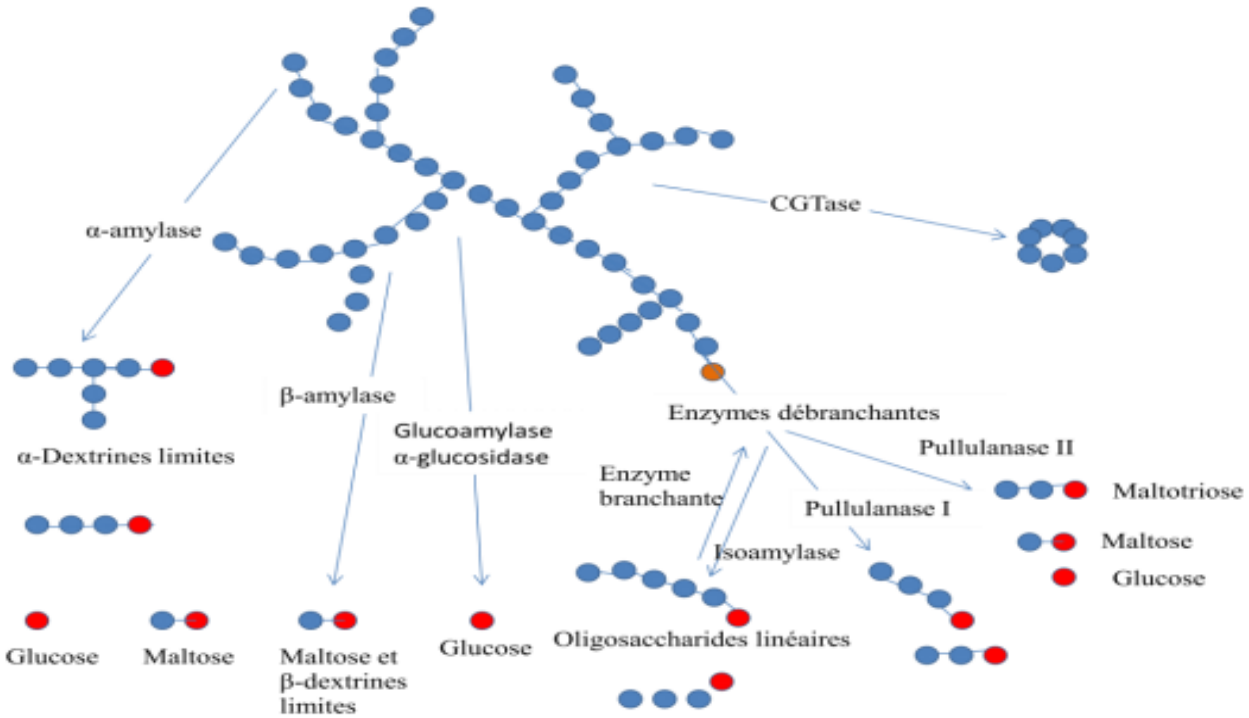


Figure 3. Présentation schématique du mode d'action des enzymes amylolytiques (Bertoldo & Antranikian, 2001).

3.3.4.3. Applications

Les carbohydrases constituées d'α-amylases, d'isomérases, de pectinases et de cellulases sont les enzymes industrielles les plus importantes du marché mondial des enzymes. Les amylases à elles seules couvrent, en 2015, 30.5% de ce marché avec une forte application dans le secteur de l'alimentation et des boissons (Morvan, 2010).

Les amylases ont de nombreuses applications et les principales enzymes amylolytiques utilisées sont l'α-amylase, la β-amylase, la glucoamylase, la pullulanase, la maltase et l'α-1,6 glucosidase. Parmi ces industries nous pouvons citer :

- **L'industrie de la transformation de l'amidon** : est la plus connue et la plus repandue avec la conversion de l'amidon en produits plus précieux tels que les dextrines, le glucose, le fructose, le maltose, et le tréhalose. Cette industrie utilise les enzymes thermostables, pour la grande majorité

d'origine bactérienne (Saxena et *al.,* 2007).

- **L'industrie des détergents** : est la principale consommatrice d'enzymes. L'utilisation d'amylases dans les détergents améliore leur capacité à enlever les tâches notamment celles des résidus de féculents, de jus de viande, de crème ou de chocolat (Olsen & Falholt 1998). En outre, les amylases ne présetent aucun danger sur l'environnement.

- **L'industrie du textile** : Les amylases sont utilisées dans le processus de désencollage, qui consiste à enlever l'amidon des fils qui y a été mis pour rendre le tissu plus solide et rendent le processus de tissage plus rapide et sécurisé (Gupta et *al.,* 2003).

- **L'industrie de l'alimentation :** utilise les amylases lors de nombreux processus, tel que cuisson de certains aliments, brassage de la bière, clarification des jus de fruits et préparation de sirop d'amidon (Couto & Sanroman 2006). En boulangerie, les amylases sont ajoutées à la pâte pour dégrader l'amidon de la farine en sous unités (dextrines) pour un meilleur taux de fermentation par la levure et une diminution de la viscosité de la pâte ce qui permet d'obtenir plus de volume et une meilleure texture ; l'amylase joue aussi un rôle d'anti-rassissement et de rétention de saveur.

3.3.4.4. Halophiles producteurs d'amylases

Parmi les premières amylases décrites, celle produite par *Halobacterium salinarum* (Good et Hartman, 1970). Par la suite, l'isolement et la caractérisation de diverses amylases produites par des Archaea ont été réalisés, comme l'amylase produite par *Haloferax* sp. (Bajpai et *al.,* 2015), ainsi que d'autres amylases produites par plusieurs bactéries halophiles et halotolérantes : *Bacillus* sp. *Pseudoalteromonas* spp., *Thalassobacillus* sp., et *Exiguobacterium* sp. (Kiran et *al.,* 2008 ; Ardakani et *al.,* 2012 ; Li et *al.*, 2012 ; Chang et *al.,* 2013).

3.3.5. Cellulases

3.3.5.1. Définitions

Les cellulases sont des enzymes appartenant aux glycosides hydrolases mais qui se distinguent par leurs aptitudes à hydrolyser les liaisons β-osidiques entre les résidus glycosyliques (Lynd et *al.,* 2002). Généralement la structure des cellulases est modulaire avec deux domaines fonctionnels, le site catalytique et le site de fixation du substrat. Il existe de nombreuses cellulases bactériennes différentes.

C'est un système enzymatique complexe, composé de trois types principaux d'enzymes: Endo β (1-4)-glucanase ou endocellulase (EC 3.2.1.4), Exo β (1-4)- glucanase ou cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) et β (1-4)-glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21) (Xu, 2002).

Dans les milieux de culture et milieu de révélation de l'activité cellulase, le substrat utilisé est la carboxyméthylcellulose d'origine synthétique, un éther de cellulose très hygroscopique. Elle est souvent utilisée sous la forme de son sel de sodium : la carboxyméthylcellulose de sodium. Son utilisation fréquente est due à sa solubilité dans l'eau et dans certains solvants, contrairement à la cellulose. La structure du monomère de CMC contient deux substituants cyclohexanes hexagonaux avec quelques radicaux substitués (Fig. 4).

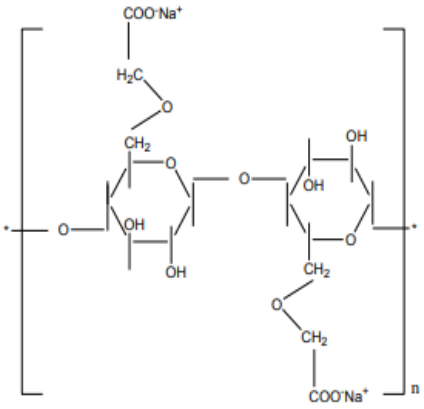


Figure 4. Structure du Carboxyméthylcellulose (CMC).

3.3.5.2. Mode d'action

Sur le CMC :

La carboxyméthylcellulose porte de nombreux substituants qui la rendent soluble, donc très accessible aux enzymes hydrolytiques. Cependant, les substituants entravent l'accès du substrat au site actif de l'enzyme. Par conséquent, l'hydrolyse par les exoglucanases, telles que les cellobiohydrolases, s'arrête très rapidement dès que l'enzyme frappe un résidu substitué. Les endoglucanases agissent en premier en coupant au hasard sur des sites amorphes internes des chaînes de polysaccharides, générant des oligosaccharides de différentes longueurs. Ensuite, les exoglucanases agissent sur les extrémités réductrices et/ou non réductrices des chaînes de polysaccharides du cellobiose (cellobiohydrolase) (Wirick, 1968).

Sur la cellulose :

Selon l'organisme producteur, différents mécanismes de dégradation de la cellulose sont employés. L'hydrolyse enzymatique de la cellulose est un processus complexe qui exige la participation de plusieurs enzymes. La plupart des cellulases sont constituées d'un domaine de liaison aux glucides (CBD) qui est responsable de l'augmentation de l'interaction entre la cellulase et la surface de la cellulose (Takashima et *al.*, 1998). L'endoglucanase (EG) qui est très active sur les celluloses solubles (CMC), attaque la cellulose microcristalline dans les régions amorphes, créant des failles dans les chaînes linéaires, perturbant la structure cristalline de la cellulose (Xu et *al.*, 2000). Cette attaque se fait au hasard et rompt les liaisons internes de la chaîne cellulosique, ce qui crée de nouvelles chaines oligosaccharidiques de longueur variable et donc de nouvelles extrémités non réductrices qui sont des sites réactifs pour la suite de la dégradation (Hasper et *al.*, 2002). Cette première attaque libère de la cellodextrine, du cellobiose et du glucose. Elle est suivie par l'attaque de l'exoglucanase sur les extrémités non réductrices produites (Xu et *al.*, 2002). L'exoglucanase seule n'est active ni sur la cellulose cristalline, ni sur la cellulose soluble (CMC), par contre, elle attaque les celluloses partiellement dégradées. Il y a deux types d'exocellulases : un type endoprocessif fonctionnant progressivement à partir de l'extrémité réductrice (Cel7A, anciennement CBH I) et un type processif fonctionnant progressivement à partir de l'extrémité non-réductrice (Cel6A anciennement CBH II) de la

cellulose. C'est l'action combinée de l'endo-exo glucanase qui mène à la conversion de la cellulose en cellobiose. La dernière étape est l'obtention du glucose par l'action de la cellobiase qui hydrolyse les liaisons β (1-4) glycosidiques du cellobiose (Onsori et *al.*, 2005) (Fig 5) .

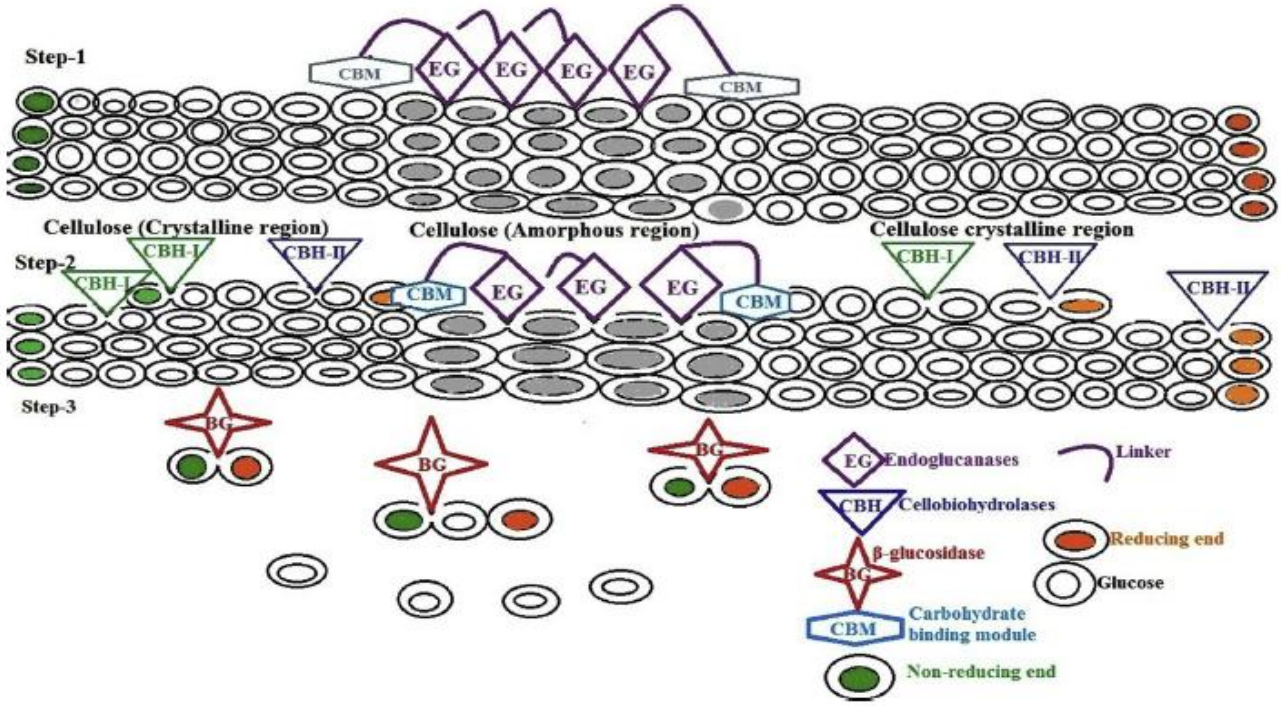


Figure 5. Schéma illustrant les étapes de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose (Behera et *al.*, 2017).

3.3.5.3. Applications

C'est dans l'alimentation animale que les cellulases ont été utilisées comme additifs pour l'alimentation. L'addition de cellulases aux aliments pour volailles ou porcins améliore la digestibilité de leur fraction cellulosique et permettent ainsi de réduire à la fois les consommations de sources d'énergie comme l'amidon et à la fois l'excrétion de cellulose non digérée (la charge polluante des excréments) (Chesson, 1987).

- **Industrie du textile et des détergents:** les cellulases sont principalement utilisées dans l'industrie textile pour améliorer la qualité des tissus en contrôlant les modifications de la fibre cellulosique (Bhat, 2000) et pour donner l'aspect délavé aux vêtements (Gusakov et al., 2000). Les cellulases agissent sur les extrémités des fibres qui dépassent de la surface du tissu et le rendent brillant et lisse (Sukumaran et al., 2005).

- **Industrie papetière :** utilise des cellulases qui permettent la modification de la fibre du papier et la fabrication de papier mou comme par exemple les serviettes en papier et les couches (Thomas et al., 2013).

- **Industrie bioéthanol :** Cette alternative au carburant vise à réduire la pollution engendrée par les combustibles fossiles tels que le pétrole et le charbon. Le bioéthanol est élaboré à partir de la biomasse végétale, son rendement énergétique étant voisin de celui de l'essence. Le bioéthanol obtenu à partir de substrats fermentescibles (canne à sucre, betterave sucrière, maïs, orge, blé, pomme de terre…), est appelé carburant de première génération (Thérien, 2006), alors que le carburant de deuxième

génération est obtenu à partir de la cellulose (résidus agricoles comme la paille, les cannes de maïs ou les résidus forestiers). La cellulase augmente la production du bioéthanol par l'hydrolyse des matériaux cellulosiques prétraités pour les sucres fermentescibles (Wang et al., 2009).

- **L'industrie agroalimentaire :** les enzymes cellulolytiques, principalement les cellulases mais aussi les pectinases et les hémicellulases, sont utilisées pour éliminer les substances phénoliques des jus. Ces enzymes sont utilisées pour macérer les pulpes de fruits jusqu'à une liquéfaction maximale pour réduire rapidement leur viscosité et pour permettre d'obtenir un rendement en jus plus nutritif, avec une meilleure stabilité et une réduction du temps de traitement (Grassin & Fauquembergue 1996). Un autre rôle important des enzymes de macération dans l'extraction de l'huile d'olive est d'obtenir des niveaux plus élevés d'antioxydants et de vitamine E (Bhat et al., 2000). Les cellulases sont également utilisées pour la production de colorants alimentaires car elles perturbent la paroi cellulaire de plantes et de fruits (Pomme de terre, carotte, écorce d'orange) ce qui libère de la caraoténoïde qui est l'un des principaux colorants utilisé dans l'agroalimentaire (Cinar, 2005).

- **L'industrie thérapeutique :** un complément alimentaire contenant de la cellulase « Digestin » est présent sur le marché pour aider à la digestion (Gupta et al., 2013). D'autres cellulases, comme celles de Trichoderma viride sont utilisées en association avec des α-amylases fongiques, pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales.

3.3.5.4. Halophiles producteurs de Cellulases

Habituellement, les cellulases halophiles et halotolérantes sont produits par les bactéries Gram positives, appartenant au genre : *Gracilibacillus, Thalassobacillus, Virgibacillus* et *Halobacillus* (Rohban et *al.,* 2009). Une cellulase extracellulaire a été produite par une bactérie marine, la *Marinimicrobium sp.* LS-A18 (Zhao et *al.,* 2012). Ces enzymes ont été rapportées comme thermostables, halostables et alcalostables. L'étude de Bhatt et *al.,* (2018) a permis d'isoler, du désert salin le Rann de Kutch à Gujarat en Inde, des souches de bactéries halophiles. Celles qui produisent des cellulases (mais aussi amylases et protéases) sont en majorité des $Gram^+$ du genre *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, et *Oceanobacillus.*

Pour les $Gram^-$, une endoglucanase halotolérante a été produite par *Vibrio* sp. G21 (Gao et *al.,* 2010). Plusieurs *Halomonas sp.* ont été étudiées pour leurs capacités à produire des enzymes, notamment les cellulases (Huang et *al.,* 2010 ; Shivanand et *al.,* 2013). Parmi les haloarchaea, une *Haloacula sp.* 2TK2, produit une cellulase qui pourrait trouver une application dans la bioremédiation des eaux usées hypersalines contenant de la cellulose (Ogan et *al.,* 2012). Une endoglucanase d'une autre *Haloarcula sp*. G10 très tolérante au NaCl (jusqu'à 3.0 M de NaCl) a été purifiée et caractérisée par Li & Yu, 2012.

3.3.6. Inulinases

3.3.6.1. Définitions

Les inulinases ou fructofuranosylhydrolases sont des enzymes d'hydrolyse qui agissent

spécifiquement sur les liaisons β-2,1 de l'inuline pour produire du fructose ou des fructo-oligosaccharides (FOS) (Roberfroid et *al.,* 1998). Selon leurs mécanismes catalytiques, les inulinases peuvent être incluses dans le groupe des transférases (EC 2.4.1), lorsqu'elles produisent des anhydrides de difructose, ou dans le groupe des hydrolases (EC 3.2.1), lorsqu'elles hydrolysent des polyfructanes sur la base d'un processus de dégradation endo ou exogène (Verachtert & De Mot 1990).

Les inulinases microbiennes appartiennent aux membres de la famille des glycosides hydrolases (famille GH 32) (Kango & Jain 2011). Les inulinases sont classées comme suit (Vijayaraghavan et *al.,* 2009) :

- endo-inulinases, EC 3.2.1.7 (créées en 1961), également nommées 2,1-β-D-fructan fructanohydrolase. Elles catalysent l'endohydrolyse des liaisons (2→1)-β-D-fructosidique de l'inuline, et elles libérent les inulo-oligosaccharides (IOS) comme l'inulotriose, l'inulotetraose et l'inulopentaose.
- exo-inulinases, EC 3.2.1.80 (créées en 1972), également appelées fructan β-fructosidase, exo-β-D-fructosidase; exo-β-fructosidase; polysaccharide β-fructofuranosidase; et fructan exohydrolase. Elles hydrolysent les résidus à extrémité non réductrices au niveau des liaisons (2 → 1) et (2 → 6) de β-D-fructofuranoses dans le fructan pour libérer du fructose. En termes général les exoinulinases hydrolysent l'inuline et il y en a qui sont actives sur le sucrose et le levan.

3.3.6.2. Mode d'action

Il y a deux mécanismes qui s'effectuent pour la dégradation de l'inuline par l'inulinase (Fig 6). L'exo-inulinase (EC 3.8.1.80) entraînent donc une dégradation séquentielle de l'extrémité non réductrice de l'inuline libérant du fructose et pour finir la libération d'une molécule de glucose (Chi et *al.,* 2009). L'endo-inulinase (EC 3.2.1.7) décompose l'inuline en inulooligosaccharides (IOS), c'est-à-dire qu'elle agit sur les liaisons internes et donne un ensemble d'inulo-oligosaccharides. Les endo-inulinases agissent de manière aléatoire sur les liaisons internes β-2,1 glycosidiques de l'inuline et produisent les fructo-oligosaccharides de différente longueur de la chaîne (Ricca et *al.,* 2007).

3.3.6.3. Applications

L'application principale des inulases est dans l'industrie agroalimentaire qui comporte une grande quantité de polysaccharides naturels utilisée pour l'obtention de sirop et dans de nombreuses boissons, mais ces dernières années, l'attention est portée sur des polysaccharides obtenus de la fermentation microbienne. Parmi tous ces polysaccharides, le fructose est le plus sucré des glucides naturels (1,2 à 2,0 fois plus sucré que le saccharose). Mais il a des effets bénéfiques sur le diabète et l'obésité. Il stimule l'absorption du calcium et la croissance des bifidobactéries (Chi et *al.,* 2009). Les inulinases produisent des inulooligosaccharides (IOS) qui sont des prébiotiques, avec des effets positifs sur la santé humaine (Rocha et *al.,* 2006). C'est pourquoi ils sont largement utilisés dans la confiserie, les desserts à base de lait, les yaourts, les fromages, les chocolats, les glaces et les sauces.

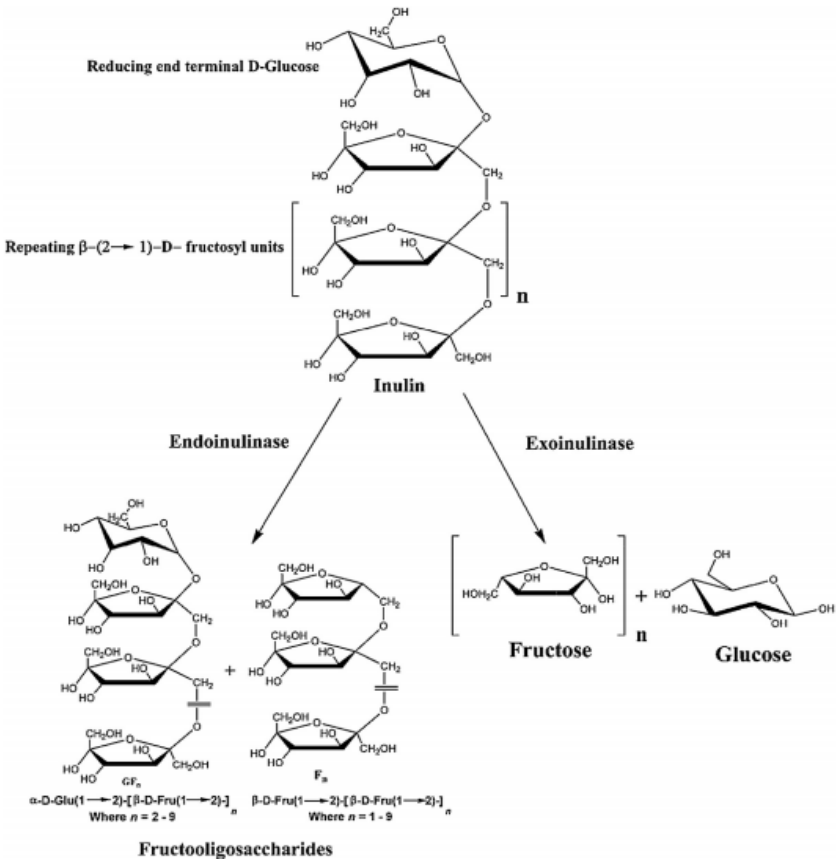


Figure 6. Production de fructose, flucose et fructo-oligosaccharides suite à l'action de l'exo et endo-inulinase (Singh & Singh 2017).

3.3.6.4. Halophiles producteurs d'Inulinases

Comparativement aux inulinases des levures et des champignons, on retrouve très peu d'inulinases de bactéries ou de micro-organismes halophiles. Mais avec les dernières avancées et connaissances sur les extrêmophiles et leurs potentiels biotechnologiques, un regain d'intérêt voit le jour. Birbir et *al,.* (2004) a reporté la production d'inulinase par *Halorubrum, Haloarcula* et *Natrinema* isolées respectivement de la mine de sel de Tuzkoy et du lac hypersalin d'Aran-Bidgol. *Bacillus cereus* MU-31, bactéries halotolérante, isolée des sédiments marins, a démontré sa capacité à produire une inulinase (Meenakshi et *al.,* 2013). Une *Alkalibacillus filiformis,* isolée du Lac Aran-Bidgol en Iran, produit une inulinase stable et active de 0.2 à 4.5 M de NaCl (Yousefi-Mokri et *al.,* 2019).

3.3.7. Pectinases

3.3.7.1. Définitions

Les enzymes pectinolytiques agissaent spécifiquement sur les polymères de pectine et ne concernent que les enzymes capables d'hydrolyser la partie galacturonique des substances pectiques. Les enzymes qui dégradent les chaînes latérales ne sont pas classées parmi les enzymes pectinolytiques. Les pectinases, modifient donc la pectine (pectate ou d'autre dalacturonanes), de façon aléatoire, elles hydrolysent les liaisons (1→4)-α-D-galactosiduroniques, elles constituent un groupe unique, complexe et hétérogène de différentes enzymes (EC 3.2.1.15). Les enzymes pectinolytiques peuvent être divisées en trois grands groupes :

- Les Protopectinases : qui dégradent les protopectines insolubles,
- Les Esterases : qui catalysent la dé-estérification de la pectine,
- Les Dépolymerases : qui catalysent l'hydrolyse de la liaison α-(1 → 4) glycosidique dans l'acide D-galacturonique.

Plus précisément, les pectinases sont classées, selon leurs mécanismes d'action sur le squelette de galacturonane, en polysaccharides hydrolases, polysaccharides lyases et glucides estérases. Cette classification se fait aussi selon la nature du substrat (pectine, acide pectique, oligogalacturonate) et les mécanismes de dégradation et de clivage de ces substrats (endo ou exo) (Favela-Torres et *al.*, 2006). Il y a donc deux grands groupes d'enzymes pectinolytiques: les pectinestérases (EC 3.1.11) ou pectine-méthylestérases (PME) et les dépolymérases. Les dépolymérases sont des hydrolases (polygalacturonases et lyases) qui possèdent des activités endo- ou exo-galacturonases et peuvent être subdivisées, en fonction du substrat et du mécanisme de clivage des liaisons glycosidiques, en quatre catégories différentes, les polygalacturonases (PG, endo (CE 3.2.1.1.5) et exo (EC 3.2.1.67), les polyméthylgalacturonases (PMG), les polygalacturonates lyases (PGL) et les polyméthylgalacturonates lyases (PMGL).

3.3.7.2. Mode d'action

La pectine est dégradée par des enzymes pectinolytiques classées en deux grands groupes : les méthylestérases, dont la fonction est d'éliminer les groupes méthoxy, et les dépolymérases (hydrolases et lyases), qui attaquent la pectine et le pectate (acide polygalacturonique : PGA).

Les pectine estérases (PE) ou pectines méthylestérases (PME) entraînent la libération de méthanol et la formation d'acide polygalacturonique (PGA) suite à l'hydrolyse des liaisons esters méthyliques adjacents à un groupe carboxyle libre des pectines (Sakai et *al.*, 1993). Ceci produit aussi l'ionisation du groupe carboxyle qui cause une variation du pH (Jayani et *al.*, 2005).

Parmi les dépolymérases, les polygalacturonases (PG) et les polyméthylgalacturonates (PMG) agissent respectivement sur les pectates et les pectines par un mécanisme d'hydrolyse. Ils catalysent l'hydrolyse des liaisons α-(1-4) glycosidiques des pectines acides (acides polygalacturoniques). Ces enzymes sont spécifiques des substances pectiques non ou partiellement estérifiées par du méthanol. Elles sont les plus étudiées parmi la famille des enzymes pectolytiques. Les PG impliquées dans l'hydrolyse des substances pectiques sont des endo-PG (EC 3.2.1.15) et des exo-PG (EC 3.2.1.67) (Jayani et *al.*, 2005). En général, l'action des endo-PG libère des mono-, di- et tri-acides galacturoniques par un mécanisme d'attaque multiple à chaîne unique ou par un mécanisme d'attaque « multi-chaîne », dans lequel les mono-, di- et trimères s'accumulent seulement après hydrolyse des produits initiaux de dépolymérisation. Les exo-PG sont moins fréquentes. Elles sont produites par des moisissures et quelques bactéries. On distingue deux types : les exo-PG fongiques avec comme produit final l'acide galacturonique et les exo-PG bactériennes qui produisent principalement l'acide digalacturonique.

Les lyases (PGL et PMGL) dégradent la pectine, les oligomères et les polymères d'acide galacturonique. Ce sont des enzymes qui rompent la liaison glycosidique C-O par un mécanisme de β-élimination sur les pectates et les pectines. Leur action dépolymérisante entraîne la libération d'uronides insaturés et d'oligomères de petite taille.

3.3.7.3. Applications

L'intérêt des pectinases dans l'industrie est né dès 1930, quand on a découvert que des pectinases fongiques pouvaient être utilisées dans la préparation de produits à base de fruits. Au cours des années suivantes, plusieurs autres hydrolases ont été développées et vendues commercialement (pectosanase, cellulase, lipase), mais la technologie était encore assez rudimentaire (Robinson, 2015). Les pectinases sont également utilisées comme additifs dans certaines boissons alcoolisés, pour le traitement du coton, le blanchissement du papier, le dégommage des fibres végétales, le traitement des eaux usées, l'extraction de l'huile végétale et pour la fermentation du café et thé (Jayani et *al.,* 2005).

- **L'industrie du textile :** les pectinases sont utilisées pour la transformation des fibres végétales. Elles sont également largement utilisées en conjonction avec des amylases, des lipases, des cellulases et des hemicellulases pour éliminer les agents d'encollage du coton tout en respectant l'environnement, parce qu'elles remplacent l'utilisation de la soude caustique. Elles sont employées également dans le dégommage des fibres de ramie (Cao et *al.,* 1992). Le « Bioscouring » est un nouveau procédé pour l'élimination des impuretés non cellulosiques à partir de la fibre avec des enzymes spécifiques, dans lequel les pectinases ont été utilisées sans aucun effet secondaire sur la dégradation de la cellulose (Hoondal et *al.,* 2000 ; Rajendran et *al.,* 2011).

- **L'industrie alimentaire** : plusieurs applications sont possibles pour les pectinases dans ce domaine. Les pectinases sont utilisées pour le raffinement de la fibre végétale, ceci peut être utilisé pour la fabrication et aussi la fermentation du café et du thé (Carr, 1985). Elles sont utilisées dans la macération des fruits lors de la fabrication du vin (Revilla & Ganzalez-san Jose 2003). Les pectinases sont aussi utilisées pour l'extraction de l'huile d'olive, de colza, de tournesol et des huiles d'agrumes, grâce à leurs capacités à dégrader les parois cellulaires et à accéder aux huiles résiduelles qui sont inaccessibles par extraction mécanique et grâce à leurs propriétés anti-émulsifiantes qui facilitent la collecte de l'huile des pectines (Kumar et *al.,* 2019).

3.3.7.4. Halophiles producteurs de Pectinases

Les pectinases sont produites par plusieurs bactéries, levures et même certaines plantes. Parmi les bactéries, le genre *Bacillus* est largement étudié pour sa capacité à produire de telles enzymes, comme *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis,* ces bactéries sont responsables de plus de 50% de la production totale d'enzyme (Ahlawat et *al.,* 2009 ; Rehman et *al.,*2014 ; Schallmey et *al.,* 2004).

En ce qui concerne des bactéries halophiles ou halotolérantes, une *Bacillus gibsonii* isolée par Li et *al.* (2005) s'est avérée capable de produire une pectinase alcaline. Une autre pectinase alcaline produite par une bactérie marine, *Bacillus subtilis,* très efficace sur les fibres de coton, a aussi été isolée

en 2013 (Joshi et *al.*, 2013). Plus récemment, en 2017, la séquence complète du génome et son étude à révélé les gènes responsables de la dégradation des polysaccharides qui permettent à la souche *Planococcus donghaensis* JH1 d'utiliser la pectine et l'acide D-Galacturonique. Ce résultat est en faveur d'un éventuel potentiel de la souche pour une utilisation industrielle (See-Too et *al.*, 2017).

3.3.8. Protéases

3.3.8.1. Définitions

Une protéase est une enzyme capable de dégrader une protéine en hydrolysant les liaisons peptidiques liant les résidus (Barrett & McDonald 1986). La définition d'une peptidase est la même que celle d'une protéase mais généralisée à tous les types de peptides. C'est le termes dont l'utilisation est recommandée par le « Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology » (NC-IUBMB) pour désigner toute enzyme capable d'hydrolyser une liaison peptidique. Les enzymes protéolytiques appartiennent au sous-groupe 4 du groupe 3 (Hydrolases) d'où l'adoption de la nomenclature (EC 3.4.) (Mala et *al.*, 1998). L'utilisation des suffixes ou des préfixes permet de définir plus précisément l'activité d'une enzyme, par exemple une exopeptidase clive un ou plusieurs résidus à l'extrémité N-terminale ou C-terminale d'une chaîne polypeptidique. Une exopeptidase qui clive uniquement à l'extrémité N-terminale un seul résidu est une aminopeptidase, si elle clive un di-ou tripeptide, c'est une dipeptidyl- ou tripeptidylpeptidase.

Comparées aux autres enzymes utilisées en biotechnologie, les protéases sont les plus quantitativement produites et employées. Elles sont classées selon plusieurs critères : l'origine (animale, végétale ou microbienne), l'action catalytique (exo et endopeptidases), la taille moléculaire, ou la spécificité vis-à-vis du substrat.

3.3.8.2. Mode d'action

Les protéases ont plusieurs mécanismes d'action, qui est d'ailleurs l'un des paramètres de classification. Le mécanisme d'action dépend de la nature de ou des acides aminés du site actif impliqué dans la catalyse. On distingue ainsi les protéases à sérine, les protéases à cystéine (ou protéases à thiol), protéases acides (ou protéases aspartiques) et les métalloprotéases.

3.3.8.3. Applications

Les protéases sont largement utilisées depuis longtemps dans les détergents, mais aussi dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et l'industrie du cuir. Elles représentent actuellement la majorité des ventes d'enzymes dans le monde. En raison de la stabilité et des propriétés des protéases halophiles, ces enzymes sont de bonnes candidates pour une utilisation dans les processus industriels (Li et *al.*, 2013).

- **Industrie pharmaceutique et médicale** : Des protéases naturelles sont utilisées et sont déjà approuvées par la FDA (Food and Drug Administration). Elles sont utilisées dans le traitement des plaies, par l'injection de certaines protéases étrangères à l'homme qui réduit l'inflammation et la douleur des tissus notamment pour le débridement (Li et *al.*, 2013 ; Craik et *al.*, 2011). De

nombreux médicaments ou compléments alimentaires à base d'enzyme sont utilisés pour améliorer la digestion, comme Créon 25 000® présenté sous forme de gélule et qui contient des lipases, des amylases et des protéases. Mangesi & Zakarija-Grkovic (2016) ont démontré le potentiel des enzymes protéolytiques pour réduire l'inconfort de l'engorgement mammaire chez les femmes allaitantes. Les protéases sont également utilisées pour (i) la dégradation ciblée de protéines pathogènes et (ii) dans les nettoyants pour prothèses dentaires et pour les lentilles de contact (Kumar et *al.,* 2016).

- **Industries alimentaires :** L'utilisation de protéases dans l'industrie alimentaire remonte à l'Antiquité. Aujourd'hui, elles sont très largement utilisées. C'est un outil puissant pour modifier les propriétés des protéines alimentaires, c'est pourquoi les protéases sont utilisées pour le traitement du poisson et des fruits de mer, mais aussi pour le traitement des protéines animales dans l'amélioration du goût et l'attendrissement de la viande. Les protéases digestives sont utilisées dans l'industrie du pain pour améliorer la texture (Rani et *al.,* 2012). La fabrication de fromages est l'une des principales applications des protéases dans l'industrie laitière, pour la coagulation et la clarification du lait (Sumantha et *al.,* 2006).

- **Industries du cuir :** L'utilisation d'enzymes en tant qu'alternatives aux produits chimiques s'est révélée efficace pour améliorer la qualité du cuir et réduire la pollution de l'environnement. Les protéases alcalines sont utilisées pour épiler, adoucir la peau, tester l'élasticité et la texture des peaux dans l'industrie du cuir (Sumantha et *al.,* 2006). Des protéases alcalines de souches de *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis* sont utilisées dans le tannage du cuir (George et *al.,* 1995 ; Sathiya, 2013)

- **Industries des détergents** : Les protéases alcalines sont utilisées pour éliminer les tâches et autres saletés en décomposant les macromolécules. Les poudres à lessive contenant des enzymes sont utilisées dans les industries de nettoyage à sec comme détachants. Les *Bacillus* sont à l'origine de la production de la majorité des protéases utilisées et ajoutées dans les détergents sont produite par des (Gupta et *al.,* 2002). Novozyme a commercialisé un produit pour le nettoyage des lentilles de contact, appelé Clear-Lens Pro®, qui permet éliminer les dépôts à base de protéines et les films de protéines des lentilles de contact. Cette protéase produite par fermentation immergée d'une bacille, hydrolyse les protéines dans les dépôts et les films, les rendant facilement dissolvables et dispersibles dans le liquide de nettoyage (Sumantha et *al.,* 2006).

3.3.8.4. Halophiles producteurs de protéases

De nombreuses halophiles se sont avérées de performantes productrices de protéases comme *Salinivibrio sp.* strain AF-2004 dont la protéase est stable dans des solvants organiques (Karbalaei-Heidari et *al.,* 2007), *Halobacillus* spp. (Karbalaei-Heidari et *al.,* 2009), *Geomicrobium sp.* EMB2 (Karan et *al.,* 2011) et *Bacillus subtilis* (Maruthiah et *al.,* 2013).

Depuis, plusieurs études se sont portées sur la recherche de nouvelles protéases des biotopes salins et hypersalins non étudiés, comme en milieu marin en Antarctique, où des bactéries protéolytiques ont été isolées, idendifiées et sont affiliées aux genres *Pseudomonas, Shewanella*, *Colwellia* et *Pseudoalteromonas* (Tropeano et *al.*, 2013). En 2015, une autre *Pseudoalteromonas* sp. 129-1 a été isolée de la mer de Chine méridionale, a été étudiée pour sa capacité à hydrolyser la caséine et a montré la plus forte activité protéase (Wu et *al.*, 2015). Plus récemment, une *Bacillus luteus* H11 isolée de la chaux sodée alcaline à produit une endoprotéase extracellulaire extrêmement halotolérante et stable en présence de 5.0 M de NaCl (Kalwasinska et *al.*, 2018).

Chapitre 2

La Zone D'étude et sa Biodiversité Bactérienne Halophile

INTRODUCTION

Ces dernières années, de nombreuses études sur la biodiversité microbienne dans divers environnements hypersalins à travers le monde sont recensées (Fernandez et *al.*, 2016 ; Menasria et *al.*, 2018 ; Safarpour et *al.*, 2018). Cependant, très peu d'études sont réalisées sur la biodiversité microbienne des biotopes extrêmes marocains (Berrada et *al.*, 2012 ; Aanniz et *al.*, 2015). Les biotopes marocains hypersalins sont très peu étudiés, et encore moins pour leurs biodiversités. Quand les micro-organismes halophiles sont isolés, c'est dans un but bien précis, par exemple, Bouchotroch et *al.*, en 1999 a travaillé sur les bactéries halophiles isolées des marais salants pour la production de polysaccharides. En effet, les bactéries halophiles sont connues pour leurs potentiels biotechnologiques. Au Maroc, nous comptons deux études portant sur la diversité de micro-organismes halophiles de deux biotopes marocains qui appartiennent aux zones humides dans le cadre de la Convention de Ramsar, convention relative aux zones humides d'importance internationale. Il s'agit du Bas-Loukkos et de la lagune Sidi Boughaba (Berrada et *al.*, 2012 ; Douma et *al.*, 2016).

L'interaction de la composition des sols et de l'eau de biotopes extrêmes sur la biodiversité microbienne n'a pas été effectuée dans certaines études de milieux hypersalins. A part une caractérisation strictement géologique de la zone d'étude (le Pré-Rif) par Maurer en 1959 et par Michard et *al.*, en 2014, et une étude sur la biodiversité des actinomycètes de la région de Taza réalisée par El Karkouri et *al.*, 2019, la région est très peu étudiée, d'où le choix de ces sites qui sont aussi connus pour être une zone composée de gypse et de sel.

Les objectifs de ce chapitre sont :

- Caractérisation et classification des biotopes de la zone d'étude
- Obtention d'une collection bactérienne halophile et halotolérante
- Mise en évidence d'une relation entre paramètres physico-chimiques de la zone d'étude et la biodiversité bactérienne
- Appréhension de la biodiversité et de la distribution bactérienne dans des écosystèmes naturels et artificiels

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Présentation de la zone d'étude

La zone d'étude est localisée dans la région de Fès-Meknès, située au centre nord du Maroc dans le Pré-Rif (Fig. 7) dont le relief bas est aéré. Le Pré-Rif est une région géologiquement caractérisée par l'abondance d'«affleurements triasiques» qui forment un complexe lithologique composé d'ophites et d'argiles salées, avec la prédominance de marne, de marno-calcaire et de schistes (Sadiki et *al.*, 2004). Les principales zones sont situées dans les provinces de Fès et de Taza, où il est courant de trouver des étangs salés et les carrières de gypse (Michard et *al.*, 2014 ; Rafai & Raji 2017). Les formations triasiques de cette région dégagent des quantités massives de sel rocheux exploité dans les bassins de décantation traditionnels (marais salants). Ces biotopes constituent une source non étudiée de micro-organismes halophiles.

Comme le montre la figure 7, il y a trois sites d'échantillonnages : le site 1 : situé au Nord de Fès, c'est une mine naturelle de sel, le site 2 : situé dans le marais salant artificiel de Meknassa à l'ouest de Taza et le site 3 : situé dans le marais salant artificiel de Bab Marzouka à l'ouest de Taza.

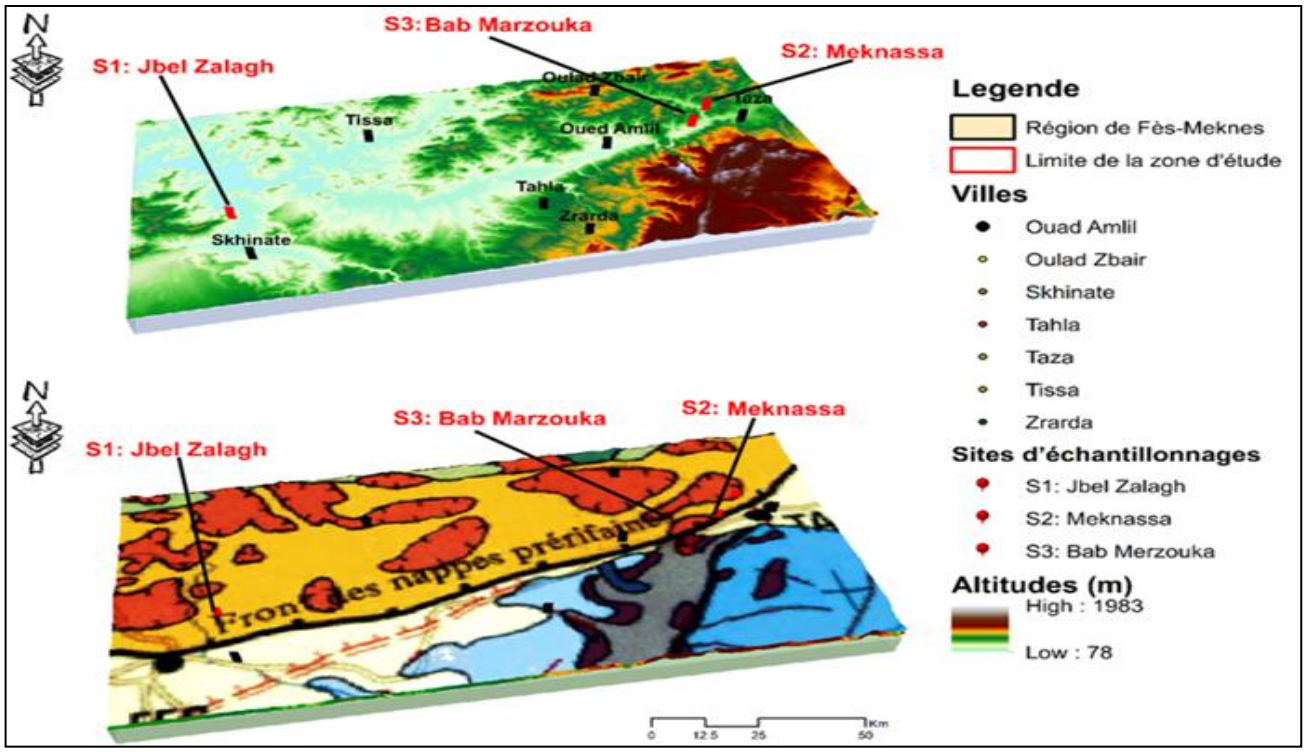


Figure 7. Localisation de la mine de sel de Jbel Zalagh à Fès et des marais salants de Taza au Maroc.

1.1. La mine de sel du Jbel Zalagh de Fès (site 1)

Orienté Nord-Est/Sud-Ouest, le Jbel Zalagh culmine à environ 900 mètres (Charroud et *al.*, 2007). C'est une ride pré rifaine au sud de la chaîne éponyme. Il correspond aux derniers plissements du Rif dans cette orientation Nord-Est/Sud-Ouest. La partie la plus redressée de cet

anticlinal est composée des terrains les plus anciens du calcaire jurassique et crétacé. De sa composition, il n'est donc pas étrange de trouver dans Jbel Zalagh une mine naturelle de sel, exploitée de 1980 à 2000. Cette mine de sel inexploitée au jour d'aujourd'hui, représente le site 1 de la présente étude (34° 7'34.95"N 4°54'51.67"W) (Fig 8). Elle est située à une altitude de 700 m, et est entourée de cultures de blé et d'oliviers.



Figure 8. Image du site 1 : la mine de sel de Jbel Zalagh (34° 7'34.95"N 4°54'51.67"W).

1.2. Les marais salants de Taza

Les marais salants artificiels de Taza sont d'anciens bassins d'évaporation de l'eau salée pour la production de sel de table. Cette zone se situe dans le même étage bioclimatique que le site 1.

1.2.1. Le marais salant de Meknassa (Site 2)

Le relief de la commune de Meknassa Charkia est très varié, avec une dominance de l'aspect montagneux raide, ponctué par un ensemble de collines et de cimes. Le site 2 est situé dans une vallée d'une altitude de 418 m (Fig. 8).



Figure 9. Image du site 2 : le marais salant de Meknassa (34°15'50.21"N 4° 3'26.46"W).

1.2.2. Le marais salant de Bab Marzouka (Site 3)

La région du site de Bab Marzouka est à 508 m d'altitude et est située en amont du bassin d'Inaouène avec des moyennes de température de 12 – 34°C. Le site 3 est situé dans une vallée d'une altitude de 385 m (Fig. 10).



Figure 10. Image du site 3 : le marais salant de Bab Marzouka (34°13'17.29"N 4° 6'24.66"W).

2. Echantillonnage

Les échantillons liquides ont été prélevés à partir des bassins de décantation des marais salants ou de la mine de sel, la boue représente le mélange d'eau et de sol du bord de ces bassins. Le sol représente la partie sèche autour des bassins ou de la mine, qui est un sol sans végétation, peu fréquenté et souvent recouvert de cristaux de sel. Les sédiments salins sont des cristaux de sel bruts (sel Gemme ou encore halite) que l'on retrouve dans la mine de sel. L'eau de la source de la mine de sel (Site 1) se trouve à moins de 5 kilomètres et irrige la zone où se situe la mine.

Ces échantillons d'eau, de boue et de sol ont été prélevés de la mine de sel et des marais salants de la région de Fès-Mèknes de manière aseptique, puis transportés au laboratoire et analysés dans les 10 heures après les prélèvements.

3. Caractérisation physico-chimique de la zone d'étude

3.1. Le profil minéral

Le profil minéral des échantillons a été analysé par « Atomic emission spectroscopy » avec « Induction Coupled Plasma » (I.C.P) et effectué au Centre d'Innovation de l'université Sidi Mohamed Ben Abdellah à Fès.

3.2. La conductivité et salinité

La conductivité et la salinité ont été mesurées grâce à un conductimètre « Water Quality Instrument, YSI Scientific » sur un échantillon de sol préalablement séché à l'air, tamisé et porté à une teneur en eau donnée. Tous les échantillons de sol ont été préparés de la même manière, c'est-à-dire un rapport sol/eau de 1/5 (P/V), soit un volume d'eau de 50 ml pour 10g de sol (Montoroi 1997).

3.3. Le taux d'humidité et la matière organique

Le taux d'humidité et la matière organique sont évalués par la perte de masse de 1 g d'échantillon sec après chauffage à 105°C et à 525°C, respectivement. Dans une capsule tarée (m) on place un échantillon, on obtient m1 la masse globale en gramme. Le sédiment est séché en plaçant la capsule dans une étuve réglée à 105°C jusqu'à obtention d'une masse constante

(généralement après 24h), soit m2. Le pourcentage d'humidité est obtenu à partir de la relation suivante (Rodier et *al.*, 2009 ; Graf-Rosenfellner et *al.*, 2016):

$$Humidité\ (\%) = \frac{(m1 - m2)}{(m1 - m)} \text{ x } 100$$

Ensuite la capsule est placée dans un four (Nabertherm/Program Controller S19), la température est augmentée jusqu'à 525°C. Après 4 heures, puis refroidissement, la capsule est pesée, soit m3. L'étape est refaite une 2ème fois pour s'assurer que la masse obtenue est constante :

$$Matière\ organique\ (perte\ à\ feu)(\%) = \frac{(m2 - m3)}{(m2 - m)} \text{ x } 100$$

3.4. La DBO_5 et DCO soluble et totale

La Demande Chimique en Oxygène, DCO, s'exprime en milligramme par litre (mg/l) d'oxygène et correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder, dans des conditions opératoires définies, les matières organiques présentes dans un échantillon donné. L'oxydation est réalisée ici par un réactif ayant un pouvoir d'oxydation puissant (le permanganate de potassium à chaud en milieu acide). Pour mesurer la DCO totale (DCOt), on prend 1g d'échantillon solide auquel on ajoute 10 ml d'eau distillée à partir de laquelle 2 ml d'échantillon sont analysés dans le DCOmètre (COD Reactor, Hach). Pour la mesure de la DCO soluble (DBOs) les échantillons sont centrifugés à 6000 rpm durant 10 minutes et 2 ml du surnageant sont analysés dans le DCOmètre.

La Demande Biochimique en Oxygène, DBO5, représente la quantité d'oxygène nécessaire aux micro-organismes pour dégrader la matière organique. Les échantillons sont incubés à 20°C, dans le noir et pendant cinq jours dans un dispositif de type « Oxitop (ISO6) » et BODmètre. La DBO_5 est exprimé en milligrames d'oxygène par litre.

3.5. Les sels totaux dissous

Les sels dissous totaux sont déterminés à 180°C par l'évaporation d'un volume d'échantillon de V=10 ml, dans un creuset en porcelaine de masse initiale m, jusqu'à obtention d'une masse constante m_1 (généralement après 24h) (Rodier et *al.*, 2009).

$$Sels\ dissous\ totaux\ (\%) = \frac{(m1 - m)}{V} \text{ x } 100$$

4. Corrélation entre les paramètres physico-chimiques et la charge bactérienne

Pour évaluer la dépendance et l'effet entre les paramètres physico-chimiques des échantillons prélevés des différents sites et la charge bactérienne obtenue, une matrice de corrélation a été réalisée et peut être visualisée en utilisant un corrélogramme. L'intensité de la couleur et la taille des cercles sur les figures sont proportionnelles aux coefficients de corrélation. Le package « **corrplot** » de R a été utilisé pour ce travail.

5. Isolement, purification et conservation des souches

Les bactéries ont été isolées à partir d'échantillons liquides et d'échantillons solides. 100µl d'échantillon et des dilutions décimales successices sont étalés sur le milieu LB agar contenant différentes concentration en NaCl (0.0 g/l à 330 g/l). Les boites Petri sont incubées à 37°C, pendant 24h. Le dénombrement d'UFC est effectué et des colonies bactériennes indépendantes et de morphologies différentes ont été purifiées et stockées pour une utilisation ultérieure.

6. Caractérisation phénotypique des souches

Les caractéristiques phénotypiques des souches isolées ont été évaluées sur la base des approches décrites par Gerhardt et *al.*, 1994.

6.1. Caractérisation morphologique

6.1.1. Caractérisation macroscopique

L'ensemble des isolats bactériens est étudié macroscopiquement et est différencié en se basant sur leurs caractères culturaux et morphologiques : la couleur, la forme, la taille, le contour, le relief, etc… Certains aspects comme l'odeur émise ou le changement de coloration du milieu ont été notés.

6.1.2. Caractérisation microscopique

L'analyse microscopique selon la technique de Dussault (1955) nous a permis de déterminer la forme (bacilles, coques,…etc), le mode de groupement et le type de Gram.

6.2. Caractérisation physico-chimique

6.2.1. Répartition des isolats selon leur halophilisme

Cette répartition est réalisée sur le milieu LB solide à pH 7,2 contenant des concentrations finales variables en NaCl de 0.2 M, 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M, 2.0 M, 2.5 M, 3.0 M, 3.5 M, 4.0 M, 4.5 M, 5.0 M et 5.5 M. Les boîtes de Petri sont incubées à 37°C en condition d'aérobiose et ceci pendant 24 à 48h. Chaque isolat a été classifié de manière typique selon Ventosa & Arahal (2009).

6.2.2. Croissance à différents pH

L'effet du pH sur la croissance des isolats est étudié sur LB agar à 0.2 M, 1.0 M ou 2.5 M de NaCl et à différentes valeurs de pH : 4.2, 5.2, 6.2, 7.2, 8.2, 9.2, 10.2 et 11.2. Les boîtes ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24 à 48h.

6.2.3. Croissance à différentes températures

La thermo tolérance des isolats est évaluée sur milieu LB agar à 0.2 M, 1.0 M ou 2.5 M de NaCl et pH 7,2. Les boîtes ensemencées sont incubées à 10 ; 25 ; 30 ; 37 ; 40 ; 50 et 60°C, pendant 24 à 48h.

6.2.4. Utilisation de substrat carbonaté

Le test d'assimilation des sucres est effectué sur milieu Minimum M9 (composition : 6 g/l Na_2HPO_4, 3 g/l KH_2PO_4, 1 g/l NH_4Cl) supplémenté d'agar et à 0.2 M, 1.0 M ou 2.5 M de NaCl et de 10 g/l de chaque substrat. 12 sucres sont testés dans cette étude : L-Arabinose, D-Fructose, D-

Galactose, D-Glucose, D-Mannose, D-Raffinose, Lactose monohydrate, D-Maltose, Sacharrose, Ribose, D-Sorbitol and D-Xylose. Les isolats ont aussi été testés sur milieu M9 sans source de carbone, comme témoin négatif.

6.2.5. Sensibilité aux antibiotiques

Cette étude est réalisée par utilisation de la méthode standard de diffussion en milieu gélosé décrite par CA-SFM/ EUAST 2019, technique des disques sur le milieu Müeller-Hinton gélosé (). Après 24h d'incubation dans le milieu LB additionné de la concentration en NaCl adéquate à la catégorie d'halophilisme des souches (0.2 M, 1.0 M et 2.5M), la culture est étalée sur le milieu gélosé. Les antibiotiques testés sont : kanamycine (30 µg/ml), ampicilline (10 µg/ml), amoxicilline-acide clavulanique (20µg/ml et 10µg/ml), flucoxalline (30 µg/ml), ciprofloxacine (5µg/ ml), chloramphenicole (30 µg/ml) et streptomycine (30 µg/ml). Le disque contenant l'antibiotique mesure 6 mm, la souche est qualifiée de sensible quand le diamètre d'inhibition est supérieur ou égal à 8 mm. Si celui-ci est inférieur on catégorise la souche de sensible (Karroub, 2007).

6.3. Caractérisation biochimique

Les tests comprennent la motilité et la sporulation, les activités de catalase et d'oxydase, la fermentation de certains sucres et d'autres tests standardisés pour l'identification bactériologique (Willey et *al.,* 2008). Tous les tests sont effectués à 37°C, à différentes concentrations en NaCl, selon la catégorie d'halophilisme des isolats.

- **Recherche de la catalase :** La présence de la catalase est mise en évidence en mettant en contact une goutte d'eau oxygénée avec une colonie selon la méthode de « Slide (drop) » (Reiner, 2010). La présence d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles d'oxygène.
- **Recherche de l'oxydase :** Il s'agit d'une réaction colorée, qualitative, pour la mise en évidence de la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder le réactif : N Diméthyl paraphénylène diamine. Cette oxydation se manifeste par l'apparition d'une coloration violette.
- **Recherche des DNases :** L'activité DNases des isolats testés est révélée sur le milieu DNA agar additionné de NaCl selon l'exigence de l'isolat. Après 48h d'incubation à 37°C, les boites sont inondées d'une solution de HCl à 1N. L'acide chlorydrique précipite l'ADN non hydrolysé est rend le milieu opaque. Les halos clairs autour des colonies montrent l'activité DNase (Jeffries et *al.,* 1957).
- **Recherche d'Uréases :** Le milieu urée-indole à base d'urée et de tryptophane, permet de mettre en évidence la présence d'une uréase, d'une tryptophanase et d'un tryptophane désaminase (TDA). La dégradation de l'urée par les bactéries libére les ions CO_3^{2-} qui va entraîner une forte alcalinisation du milieu qui sera révélée par un virage de l'indicateur de pH (le rouge de phénol) à sa teinte basique (rouge). Le milieu contient du L-tryptophane et sa

dégradation par les bactéries s'accompagne d'une production d'indole, révélée au moyen du réactif de Kovacs : en cas de réaction indole positive, un anneau rouge apparaît en surface du bouillon. La dégradation du L-tryptophane par les bactéries possédant peu s'accompagne aussi d'une production d'acide indole-pyruvique révélée au moyen d'une solution de perchlorure de fer par l'apparition d'une coloration brune.

- **Recherche de gélatinase :** Le milieu nutritif gélosé est additionné à 2% (p/v) de gélatine, les colonies sont submergées par une solution de sulfate d'ammonium à 50% et à 1N d'HCL, (à la place du réactif de Frazier (chlorure mercurique) qui est toxique). Un halo clair autour de la colonie est témoin de l'activité gélatinase (Kannan, 2002).
- **Recherche d'esculinase :** Le milieu de révélation contient : 1 g/l d'extrait de levure, 1 g/l de peptone, 2 g/l de glucose, 0.01 g/l de citrate d'ammonium ferrique, 0.3 g/l d'esculine et 20 g/l d'agar. Après 24h-48h à 37°C d'incubation, le résultat se traduit par un noircissement autour de la colonie esculinase positive (Ubeda & Briones 2007).
- **Présence de spores :** Les endospores sont mises en évidence sur des colonies âgées en faisant une coloration négative par application, après fixation et traitement à la chaleur, d'une solution de vert de malachite suivie d'une contre coloration par la Fuchsine basique, selon la technique de Bartholomew. Les spores apparaissent vertes dans des corps bactériens roses. On note la forme de la spore, sa position et la déformation éventuelle de la bactérie par la spore.
- **Mobilité :** Le milieu Mannitol-Mobilité permet l'étude de la fermentation du mannitol (reconfirmation) et la mobilité de la souche. La présence d'une faible teneur d'agar (gélose semi-molle) rend possible le déplacement des bactéries mobiles autour de la piqûre centrale. La lecture de l'utilisation du mannitol est possible grâce à la présence d'un indicateur de pH, le rouge de phénol. L'utilisation du mannitol acidifie le milieu qui peut ainsi être révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune).
- **Utilisation du citrate :** Le milieu Citrate-Simmons contient du citrate ($C_6H_8O_7$) comme unique source de carbone. La souche est citrate$^+$ s'il y a virage du bleu de bromothymol (l'indicateur de pH) du vert au bleu suite à l'alcalinisation du milieu.
- **Fermentation du glucose et lactose, production de H_2S et de gaz :** Le milieu Hajna-Kliger permet la mise en évidence de ces quatre paramètres en 24h. On distingue deux zones dans le milieu, le culot et la pente. La dégradation du glucose entraîne la formation de produits acides. L'acidification au niveau du culot est révélée par le virage de l'indicateur coloré, le rouge de phénol, à sa teinte acide (jaune). Il y a éventuellement production de gaz (H_2 ou CO_2) plus ou moins abondants, formant des bulles ou décollant la gélose. Sur la pente, deux cas peuvent alors se présenter, soit la bactérie ne peut pas dégrader le lactose et l'indicateur coloré (le rouge de phénol) revire à sa teinte basique (rouge), soit la bactérie peut utiliser le

lactose et l'indicateur de pH reste à sa teinte acide au niveau de la pente. Le H_2S forme un précipité noir avec le Fer (III).

- **Type respiratoire :** Le milieu viande foie permet de déterminer le type respiratoire d'une bactérie, c'est-à-dire définir son comportement vis-à-vis du dioxygène. Certaines bactéries ne peuvent vivre qu'en son absence, d'autres qu'en sa présence, d'autres encore sont indifférentes. Après 24 heures d'incubation à 37°C, on observe à quel niveau du tube il y a eu culture.

7. Etude phylogénétique

7.1. Extraction rapide de l'ADN génomique

Pour extraire l'ADN d'une biomasse cellulaire, la culture bactérienne sur milieu LB liquide, est centrifugée à 10 000 g pendant 10 min, le culot est remis en suspension dans 500 µl de tampon TE (Tris-HCl à 10 mM, EDTA à 1 mM et pH 8), puis on ajoute 10 g/l de SDS et 0,01 g/l de protéinase K (Sigma-France). Le mélange est incubé à 50°C pendant 5 minutes. Ensuite 2 volumes d'éthanol sont ajoutés et le mélange est centrifugé à 10 000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot obtenu est lavé avec de l'éthanol à 75%, récupéré, puis séché et ensuite remis en suspension dans 100 µL d'eau MilliQ.

7.2. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose est effectuée à la fin de l'extraction de l'ADN extrait sur un gel à 0.4% d'agarose contenant 0,5 µg/µl de bromure d'éthidium (BET). Le tampon d'électrophorèse TAE est composé de : Tris-HCl 1,6 mM ; acétate de sodium 1,6 mM ; EDTA 0,04 mM (pH 8.0). L'échantillon d'ADN est additionné de 0,1 % d'une solution de charge (bleu de bromophénol 2,5 g/l ; xylène cyanol 2,5 g/l ; EDTA 25 mM; glycérol 500 g/l). La migration se fait dans le tampon TAE, sous une tension de 80 volts. Les fragments d'ADN sont visibles aux UV à 300 nm grâce au BET contenu dans le gel et qui s'intercalle entre les bases de l'ADN et qui fluoresce sous l'UV.

7.3. La réaction de polymérisation en chaîne ou technique PCR

L'amplification de l'ADNr 16S est réalisée à l'aide d'amorces universelles 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) et 1392R (GGTTACCTTGTTACGACTT). Le mélange réactionnel a été préparé dans un volume final de 20 µl contenant 4 µl de tampon Taq (5x), 1.2 µl de $MgCl_2$ (25 mM), 4 µl de dNTP (1 mM), 0.5 µL de chaque amorce (10 µM), 0.2 µl de Taq polymérase (5 U/µl), 7.6 µL d'H_2O pur et 2 µl d'ADN extrait. L'amplification est réalisée comme décrit par Turner et *al.,* 1999, dans un thermocycleur de type « Eppendorf Mastercycler Personal ».

7.4. Séquençage et analyse des séquences

Le séquençage (Sanger et *al.,* 1977) de l'ADNr 16S a été effectué à la Cité d'Innovation de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah (Fès-Maroc) à l'aide d'un analyseur génétique « ABI PRISM 3130XL » (Applied Biosystems). Dans un premier temps, les séquences des gènes des

ARNr 16S obtenues et assemblées, ont été soumises à une recherche d'homologie de séquences en utilisant le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sur le site NCBI (National Center for Biotechnology Information) pour rechercher les séquences les plus proches déposées dans GenBank. Les souches ont été identifiées au niveau du genre, lorsque la similarité de séquence avec une souche type est d'au moins 98% et avec une espèce donnée lorsque la similitude de séquence est d'au moins 99,5%. Pour étudier la relation phylogénétique entre les isolats et d'autres espèces homologues, nous avons appliqué les critères de voisinage, en utilisant le logiciel MEGA X (Kumar et *al.*, 2018). Les tests de phylogénie ont été évalués en amorçant 1000 répétitions, le composite du maximum de vraisemblance a été utilisé comme modèle de substitution.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1. Caractérisation physico-chimique des échantillons de la zone d'étude

Les échantillons de sol, boue et eau des trois sites hypersalins ont fait l'objet d'une caractérisation (Tableaux 8 et 9). Le pH des échantillons est neutre à légèrement alcalin, allant de 7.0 à 8.3, ce qui correspond aux valeurs de nombreux milieux hypersalins que ce soit en Algérie mais aussi au Maroc (Oren, 2002 ; Kharroub, 2007 ; Berrada, 2012).

1.1. Le profil minéral

Le profil minéral des échantillons montre une teneur élevée en Na^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} et K^+. Les échantillons de sol et de boue des trois sites ont montré la prédominance des ions sodium et calcium, avec des concentrations allant de 1.5 g/l à plus de 1000 g/l. Les ions K^+ et Mg^{2+} ont une concentration relativement plus faible (Tableau 7). D'autres ions tels que Ni^{2+} et Cd^{2+} étaient présents à des concentrations inférieures à 0.03 g/l dans les trois sites. Cependant, les ions Al^{3+}, Co^{2+}, Cr^{2+}, Cu^{2+} et Fe^{2+} présentent des concentrations inférieures à 0.01 g/l. Ce profil minéral est similaire à celui obtenu dans l'étude du profil minéral d'échantillons prélevés de la lagune de Tebenquiche, dans le désert d'Atacama au Chili, où les ions sodium, calcium et magnésium ont été présents et prédominants parmis les ions testés (Fernandez et *al.*, 2016).

Tableau 7. Profil minéral des trois sites de la zone d'étude. *La concentration est notée en g/l pour les échantillons liquides (a) et en g/g pour les échatillons solides (b). ND: Non déterminé. WS (Water of the source) : Eau de la source, WM (Water of the Mine) : Eau de la mine, SS (Salt Sediment) : Sédiment salin, W (Water of the Site) : Eau du site, S (Soil) : Sol, M (Mud) : Boue.*

le site	Type d'échantillon	**Ca^{++}**	**K^+**	**Mg^{++}**	**Mn^{++}**	**Na^+**
Site 1, Jbel Zalagh	WS[a]	<0.01	<0.01	<0.01	0.035	1.50
	WM[a]	60.62	7.00	18.32	0.18	329.75
	SS[b]	ND	ND	ND	ND	ND
	S[b]	0.151	5.47	<0.01	0.035	>1000
	M[b]	3.09	5.58	<0.01	0.074	>1000
Site 2, Meknasse	W[a]	82.81	12.58	1.49	0.110	340.29
	S[b]	93.52	5.95	1.89	0.106	881.23
	M[b]	>1000	12.58	28.17	0.130	>1000
Site 3, Bab Marzouka	W[a]	21.33	1.43	3.74	0.171	222.16
	S[b]	725.25	12.79	35.01	0.171	657.18
	M[b]	218.29	10.03	17.08	0.117	881.18

1.2. Conductivité et Salinité

Les mesures de la conductivité électrique (CE) des échantillons de sol et de boue ont montré des valeurs allant de 5.4 dS/m à 13.9 dS/m. La CE des échantillons aqueux des sites 1, 2 et 3 a

montré des valeurs respectives de 9.3 dS/m, 10.6 dS/m et 11.3 dS/m, indiquant la présence de fortes concentrations de sel dans ces échantillons. Cependant, la CE de la source d'eau qui alimente le site 1 (WS1) a montré une valeur faible de 2.1 dS/m. Par la suite, les échantillons ont été classés en fonction de leurs valeurs de CE dans les catégories de salinité (Tableau 8).

Les échantillons de sol sont salins si EC> 4.0 dS/m, selon les normes USSLS par Richards (1954) et les échantillons liquides le sont si EC> 0.25 dS/m, selon Rhoades et *al.,* (1992). En ce qui concerne la salinité, le taux le plus faible provient de l'eau de source du Site 1, et le plus élevé est attribué aux sédiments salins du même site, ce qui est en concordance avec les valeurs de la conductivité électrique (Tableau 8). Ces valeurs montre que le site 1 à une salinité très largement supérieure à celle obtenue dans le marécage salé et le marais salant situés dans le Bas-Loukkos au Nord-Ouest du Maroc (Berrada el al., 2012) et une salinité similaire à celle de la saumure de la sebkha (dépression inondable à fond plat) d'Ezzemoul située à Aïn M'Lilla en Algérie (Kharroub et *al.,* 2007).

1.3. La matière organique et taux d'humidité

Dans la région du Pré-Rif, la matière organique est relativement peu élevée, alors que les échantillons des différents sites ont présenté des pourcentages assez élevés. Ceci peut être dû à l'irrigation et la proximité des champs de culture et donc à l'activité humaine. En ce qui concerne l'humidité, ou la teneur en eau, les valeurs sont relativement faibles dans le sol de tous les sites, et beaucoup plus élevées pour la boue (Tableau 8).

1.4. La DBO5 et DCO soluble et totale

La DBO_5 des échantillons aqueux présentent des valeurs allant de 0.54 à 1.6 (g O_2/l) et les valeurs de la DCO totale dans les sols des sites 1 et 2 (S1 et S2) sont plus élevées que celles des autres échantillons d'eau et de boue (Tableau 8). Ces valeurs élevées de DCO et DBO_5 peuvent être expliquées par (i) la concentration élevée en ions chlorure ou par (ii) la présence d'halogènes libres, caractéristique des eaux et sols salins (Belkin et *al.,* 1992), mais aussi par (iii) la proximité d'activité humaine. Boutaiba et *al.,* (2011) a décrit, dans son étude, des valeurs élevées de DBO_5 dans deux lacs salins en Algérie. En revanche, le site 3 montre des valeurs élevées de la DCO totale de l'échantillon aqueux (W3). La DBO_5 et DCO sont des paramètres complémentaires, le rapport entre DCO et DBO_5 donne une estimation de la biodégradabilité de la matière organique des échantillons. Les sites 1 et 2 ont un ratio <2 qui permet de les classer dans la catégorie facilement biodégradable, mais le site 3 a un ratio >2 ce qui le qualifie moins facilement biodégradable.

2. Corrélation entre les paramètres et la charge bactérienne

L'analyse de la charge bactérienne des échantillons solides (boue et sol) a montré une forte corrélation positive avec les ions minéraux ; principalement des ions sodium, avec une forte corrélation (0.8 ~ 1.0) pour les sites 2 et 3 et une faible corrélation positive (0.4 ~ 0.6) pour le site 1.

Tableau 8. Propritétés physiques et chimiques des échantillons des trois sites de la zone d'étude. *WS (W ater of the source) : Eau de la source, WM (Water of the Mine) : Eau de la mine, SS (Salt Sediment) :Sédiment salin, W (Water of the Site) : Eau du site, S (Soil) : Sol, M (Mud) : Boue. (a) minimum/maximum pour la saison. (b) la conductivité et la salinité sont mesurées grâce à « Water Quality Instrument, YSI Scientific ». ND: non déterminé.*

Site	**Site 1, Jbel Zalagh**					**Site 2, Meknassa**			**Site 3, Bab Marzouka**		
Type d'échantillon	WS	WM	SS	S	M	W	S	M	W	S	M
Classification des échantillons	Modérément salin	Très salin	Extrêmement salin	Salin	Légèrement salin	Très salin	Salin	Légèrement salin	Très salin	Salin	Légèrement salin
pH[a]	7.0	7.0	NA	7.7	7.9	8.0	7.6	8.1	7.5	7.7	8.3
Conductivité (dS/m)[b]	2.1	9.3	13.9	10.5	5.4	10.6	9.4	4.9	11.3	9.2	5.4
Salinité (%)[b]	4.5	19.5	29.2	22.0	12.0	22.4	19.7	10.4	23.7	19.3	11.2
CFU/g	ND	ND	$1.25.10^5$	$2.9.10^5$	$3.3.10^6$	ND	$2.85.10^6$	$2.85.10^6$	ND	$2.95.10^6$	$2.85.10^6$
CFU/L	$1.5.\ 10^6$	$2.2.10^5$	ND	ND	ND	$2.25.10^6$	ND	ND	$2.85.10^5$	ND	ND
DCO_t (g O_2/l)	3.43	3.63	ND	8.88	0.90	2.42	7.57	0.90	24.24	1.79	1.28
DBO_5 (g O_2/l)	1.53	1.24	ND	ND	ND	1.60	ND	ND	0.54	ND	ND
Humidité (%)	ND	ND	ND	12	41	ND	15	30	ND	10	35
Matière organique (%)	8	11.2	ND	6	8	6.06	7.05	10	12.5	10	11.5
Sel dissous (%)	5.4	22.9	ND	24.6	12.8	23.0	12.1	15.7	26.3	16.9	14.3

Le site 1 montre des corrélations faibles avec les ions magnésium, manganèse et calcium et des corrélations positives avec les ions sodium et potassium. Le site 2 montre des corrélations positives avec tous les ions sauf le potassium. Le site 3 montre des corrélations positives entre la charge bactérienne et tous les ions sauf le manganèse. Cependant, les charges bactériennes à partir d'échantillons aqueux ont montré une corrélation négative avec ces mêmes ions (Figure 11). De fortes corrélations ont été obtenues entre la charge bactérienne halophiles des échantillons solides (boue et sol) et les concentrations en sels des entités ioniques quantifiées dans les sites 2 et 3, alors que cette corrélation est moyenne dans le site 1. Cette situation s'est inversée dans les échantillons aqueux. De plus, en fonction du site d'isolement, la charge bactérienne a réagi différemment aux différents ions (Na, K, Mg, Mn et Ca) avec une préférence pour la présence d'ion Na^+. Ces différences de charges bactériennes provenant d'échantillons solides et aqueux peuvent s'expliquer par la disponibilité des formes ioniques des sels correspondants dans le biotope (davantage d'ions libres dans les échantillons aqueux que dans les solides). Il est communément accepté que de fort taux de salinité dans un biotope diminue le nombre de micro-organismes. Les fortes corrélations avec l'ion sodium indiquent une augmentation de la charge bactérienne halophile avec une augmentation de la concentration en sel dans les échantillons solides. Par contre, pour les échantillons aqueux de notre étude, le taux de salinité fait diminuer le nombre de micro-organismes.

La teneur en matière organique montre un pourcentage relativement élevé dans les échantillons aqueux et solides, ce qui a généralement un effet favorable sur l'activité bactérienne. Cependant, les résultats de corrélation entre la teneur en matière organique et la charge bactérienne ont montré une réponse faible et divergente dans les échantillons solides et aqueux La corrélation entre DBO5 et la charge microbienne des échantillons aqueux a montré des valeurs positives. Cependant, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la charge microbienne et la DCO totale ou la DBO5 des échantillons solides.

En ce qui concerne la teneur en eau, qui est un facteur très important et qui est généralement fortement lié à la matière organique du sol, nous avons noté que la corrélation entre la teneur en matière organique et celle en eau de l'échantillon solide est négative (<0.0) pour les sites 1 et 2 [site1 : faible corrélation négative (-0.2 ~ 0.0) et site 2 : forte corrélation négative (-0.6 ~ -0.4)], alors qu'il y a une forte corrélation positive (0.8 ~ 1.0) dans le site 3. La teneur en eau est corrélée négativement avec la charge microbienne de l'échantillon solide. Bien que les organismes dépendent fortement de l'eau dans les sols et que l'eau soit essentielle au cycle des nutriments, cela peut être dû aux variations des cycles saisonniers des précipitations et de la température, ce qui fait que la teneur en eau du sol varie dans le temps et dans l'espace. Comme on pouvait s'y attendre, la teneur en eau est en corrélation positive avec la charge microbienne des échantillons aqueux.

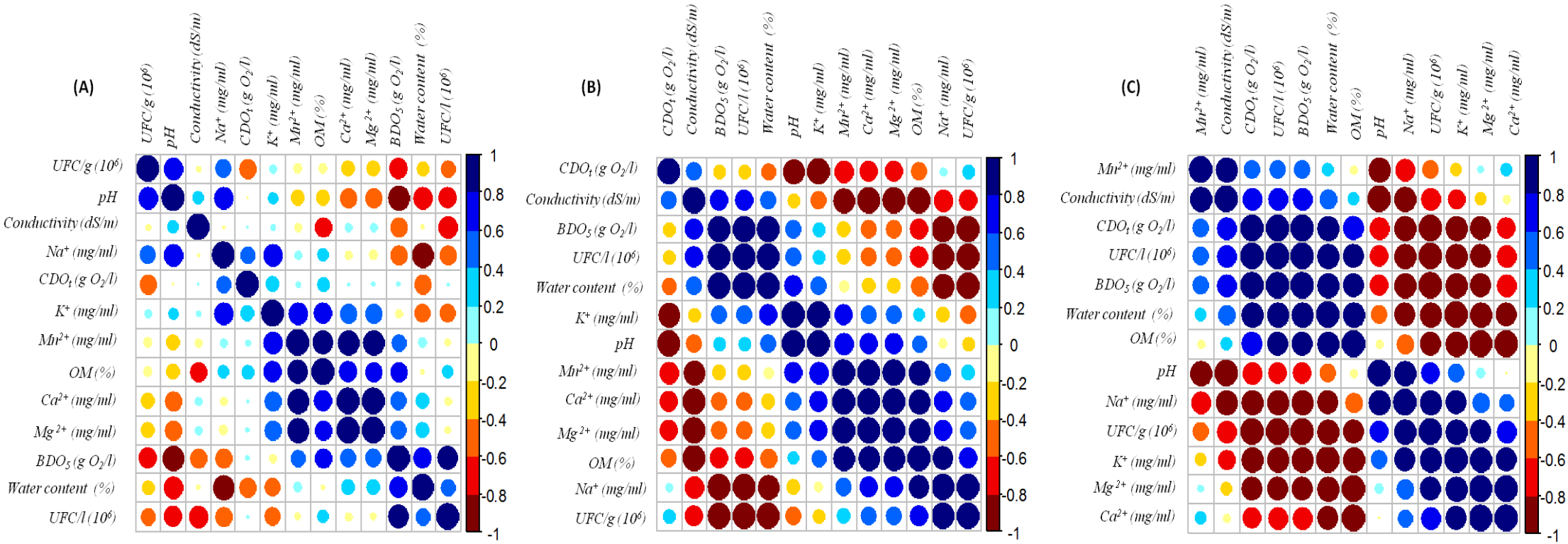


Figure 11. Matrice de corrélation entre les propriétés physico-chimiques et la charge bactérienne des échantillons solide et aqueux de site 1(A), site 2 (B) et site 3 (C).

3. Isolement et identification des isolats

L'isolement à partir de ces trois sites, dans les conditions de 1.0 et 2.5 M de NaCl, nous a permis l'obtention d'une collection bactérienne de 227 isolats (Tableau 9), le plus grand nombre d'isolats halophiles est recensé dans le site 1 (73%), suivi du site 2 (17%) et enfin le site 3 (10%). Ce résultat montre clairement que le site 1 est caractérisé par une diversite bactérienne riche par rapport aux sites 2 et 3.

Tableau 9. Distribution des isolats selon les sites et types d'échantillons. *(a) solides et (b) aqueux. ND: Non déterminé. WS (Water of the source) : Eau de la source, WM (Water of the Mine) : Eau de la mine, SS (Salt Sediment) : Sédiment salin, W (Water of the Site) : Eau du site, S (Soil) : Sol, M (Mud) : Boue.*

Site	**Site 1, JZ**					**Site 2, M**			**Site 3, BM**		
Type d'échantillon	WS[a]	WM[a]	SS[b]	S[b]	M[b]	W[a]	S[b]	M[b]	W[a]	S[b]	M[b]
Nombre d'isolats	ND	17	13	71	65	17	14	8	6	4	12
Total	**166**					**39**			**22**		

4. Caractérisation phénotypique des isolats

Un tableau avec tous les résultats d'identification est présenté dans l'annexe 1. Tableau A1

4.1. Caractérisation morphologique

Sur les 227 isolats, plusieurs pigmentations ont été observées : rose, orange, jaune, beige, blanche avec des intensités différentes, et une partie non négligeable des isolats sont apigmentés (63,4%). L'absence de pigmentation est en général une caractéristique des bactéries halophiles (Arahal et *al.,* 2002). Ce même constat est observé dans la collection bactérienne de Kharroub (2007) et Berrada (2012). Les colonies sont circulaires, convexes ou bombées, avec, pour la plupart, un contour régulier, bien que certaines montre des contours non réguliers.

Les 80 isolats sont des Gram négatifs (41/80 bacilles et 39/80 coques), et 147 sont des Gram positifs (112/147 bacilles et 35/147 coques), ce qui représente 65% de la collection. Des études sur les biotopes salins ont démontré la prédominance des Gram positifs. Gontang et *al.,* (2007) ont isolé une large proportion (1624 isolats) dans les sédiments marins prélevés dans la zone intertidale de la république des Palaos (en Micronésie). Berrada et *al.,* (2011) ont isolé 102 isolats $Gram^+$ contre seulement 22 Gram négatifs à partir d'un biotope salin marocain (Bas-Loukkos).

Dans l'étude de Bachran et *al.* en 2019 sur la diversité microbienne d'un environnement aride, naturel et salin de la vallée d'Arava, presque tous les isolats d'origine bactérienne ont été liés au phylum Firmicutes et plus précisement les Gram positifs. Dans d'autres études, ce sont les Gram négatifs qui dominent. Makhdoumi Kakhki et *al.,* 2011 n'ont isolé du lac salé d'Aran-Bidgol en Iran que des bactéries à Gram négatifs. La prédominance des Gram peut dépendre du type d'échantillon. Boyadzhieva et *al.* (2018) ont décrit la prédominance de bactéries halophiles à $Gram^+$

dans les échantillons de sol, mais avec une prédominance d'isolats à Gram⁻ dans les échantillons de boue et d'eau de deux marais salants en Bulgarie.

4.2. Caractérisation physico-chimique des isolats

4.2.1. Répartition des isolats selon leurs halophilismes

Les 227 isolats des trois sites étudiés ont été isolés à différentes concentrations de NaCl. Le site 1 se caractérise par l'abondance des bactéries halophiles isolées (73%), suivi du site 2 et du site 3 avec un taux d'abondance de 17% et environ 10%, respectivement. Les bactéries halophiles modérées constituent la catégorie la plus représentée avec un taux de 44% (100/227), suivies des bactéries légèrement halophiles qui représente 32% de la collection (73/227). Les bactéries halotolérantes sont représentées dans la collection par 35/227 (32%) alors que 19 sur 227 bactéries sont halophiles extrêmes (8.5%). Cette dernière catégorie est davantage représentée dans le site 1 alors qu'une seule bactérie halophile extrême est isolée du site 2 et aucune halophile extrême n'a été isolée du site 3.

Tableau 10. Distribution des isolats selon les sites et catégories d'halophilisme.

	Halotolérant (0 à 5.5 M)	**Légèrement Halophile (0.2 à 1.0 M)**	**Halophile Modérée (0.5 à 2.5 M)**	**Halophile Extrême (2.5 à 5.5 M)**	**Total**
Site 1	20	57	71	18	**166**
Site 2	8	8	22	1	**39**
Site 3	7	8	7	0	**22**
Total	**35**	**73**	**100**	**19**	**227**

4.2.2. Croissance à différents pH

Les isolats testés dotés d'au moins une activité enzymatique ont montré une préférence pour les pH 6.2 et 7.2, ce qui montre le caractère neutrophile des souches de la collection comme l'atteste la figure 12.

L'analyse de la croissance à différents pH de la collection bactérienne montre un caractère neutrophile. En effet, 83 isolats poussent à pH 6.2 contre 18 isolats seulement, qui poussent à pH 8.2, contrairement aux études qui pointent du doigt la rareté des organismes acidophiles en général (Oren, 2006 ; Kharroub, 2007).

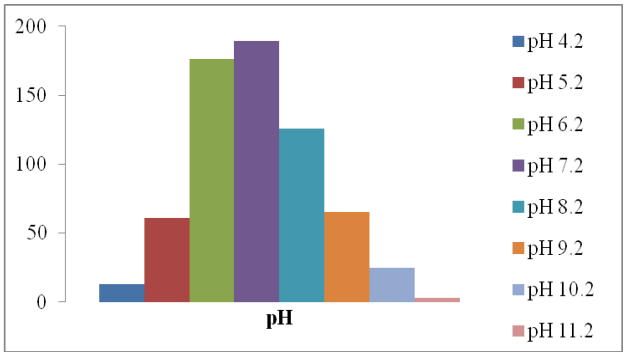


Figure 12. Répartition des isolats selon leurs croissances à différents pH.

4.2.3. Croissance à différentes températures

8% des isolats de la collection bactérienne sont thermo-tolérants. Seulement 16 isolats de la collection sont capables de croître à 10°C et peuvent être considérés comme psychro-tolérants. Les souches bactériennes sont majoritairement mésophile comme le montre la figure 13 :

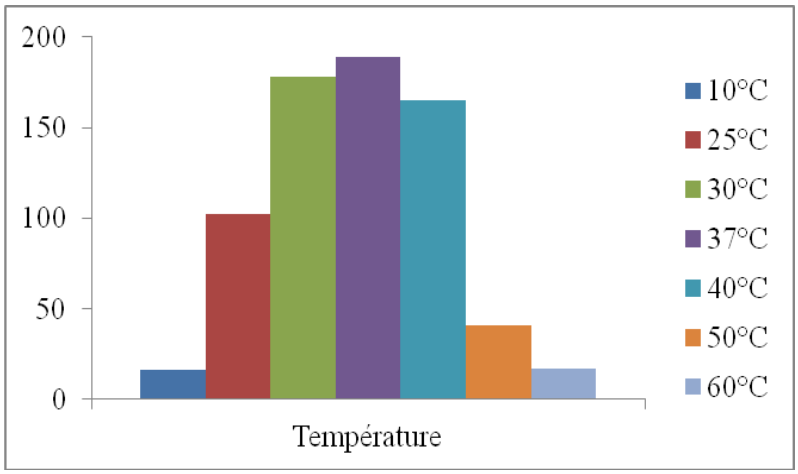


Figure 13. Répartition des isolats selon leurs croissances à différentes températures (°C).

4.2.4. Utilisation de substrats carbonatés

Pour ce test, les isolats ont montré une croissance sur la majorité des substrats testés (Figure 14). 10% de la collection arrive à croître sur le milieu M9 sans source de carbone ce qui peut s'expliquer par le fait qu'elles sont prototrophes ou autotrophes, alors que la majorité de la collection est auxotrophes ou hétérotrophes.

La figure 14 montre aussi que le glucose et mannitol sont les deux sucres les moins utilisés par les isolats de la collection.

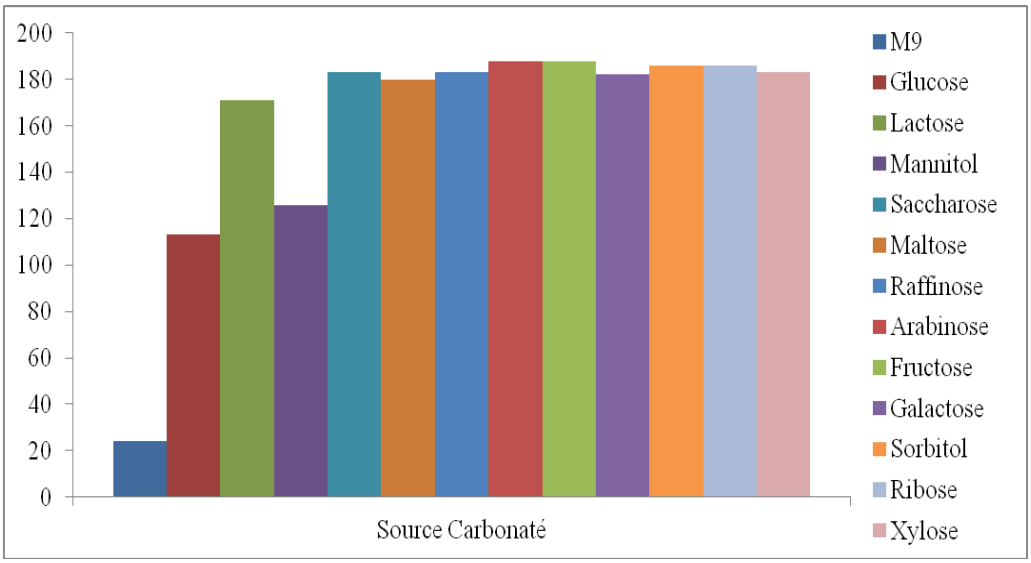


Figure 14. Répartition des isolats selon leurs croissances en présence de différents substrats.

4.2.5. Résistance aux antibiotiques

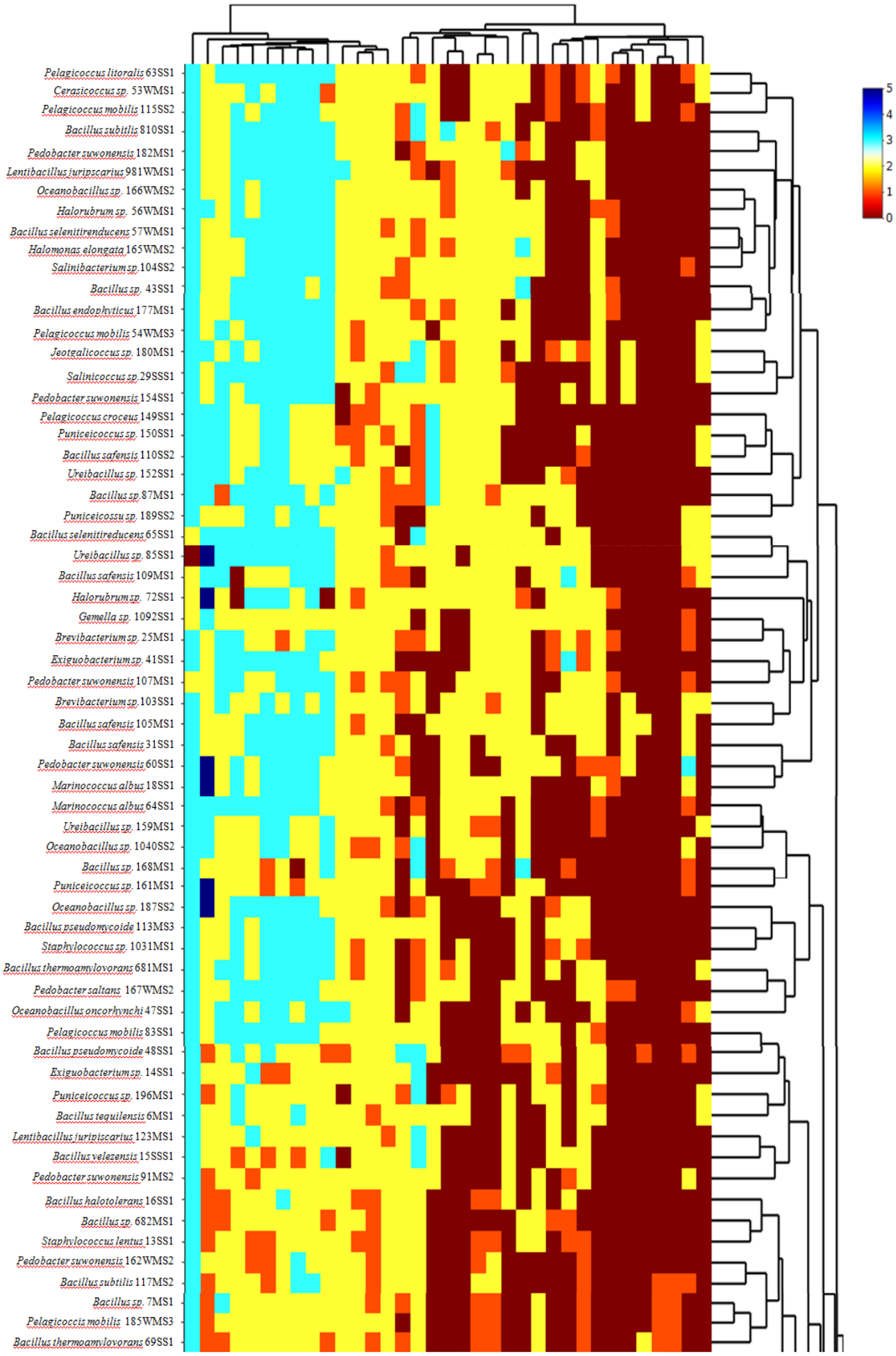
En ce qui concerne l'antibiogramme réalisé, les résultats sont représentés dans le tableau A2 de l'Annexe 1. 57% des isolats sont sensibles à la fois aux 7 antibiotiques testés avec une grande

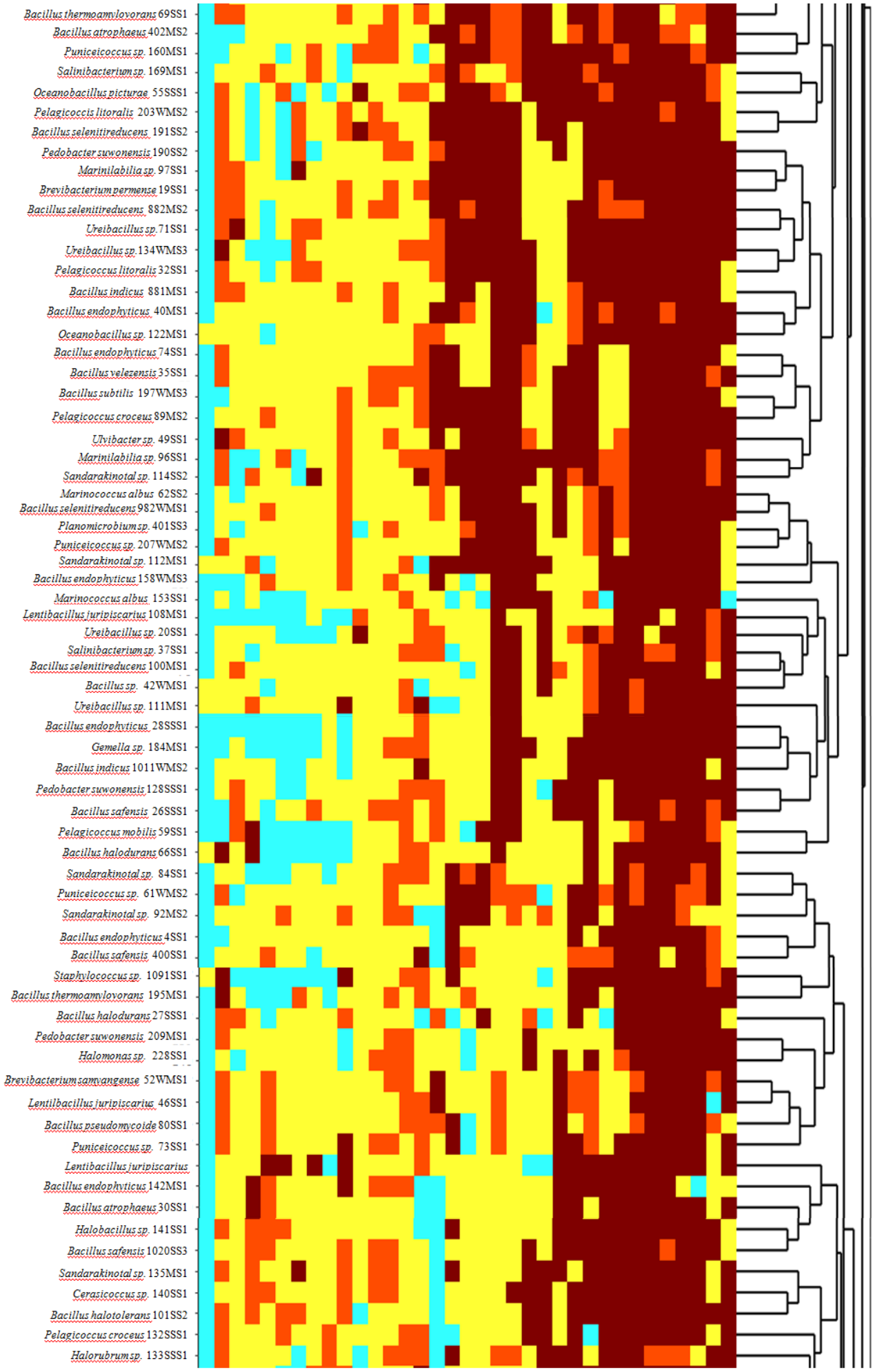
sensibilité à la kanamycine, la streptomycine, le chloramphénicol ou l'amoxicilline-acide clavulanique (89, 88 87% ou 83%), respectivement). 41% des isolats se sont avérés résistants à la fois à la flucoxalline et à l'ampicilline. La résistance à l'ampicilline des bactéries halophiles a été remarquée dans de nombreuses études, comme celle de Bonelo et *al.,* (1984) sur des micro-organismes halophiles extrêmes. Birbir et *al.,* (2004) a également constaté que les isolats halophiles extrêmes de sa collection obtenue de la mine de sel de Tuzkoy en Turquie, sont résistants à l'ampicilline. L'étude de Ghosh et *al.,* (2010) à encore démontré la résistance à l'ampicilline des micro-organismes halophiles isolés d'effluent de tanneries en Inde.

4.3. Caractérisation biochimique des souches

Les 189 isolats qui sont dotés d'une activité enzymatique, sont caractérisés et positionnés au niveau du genre en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques telles que décrites par le Manuel de bactériologie systématique de Bergey (Boone et *al.*, 2001; De Vos et *al.*, 2012; Whitman et *al.*, 2012; Krieg et *al.*, 2012). L'identification a été confirmée pour 56 isolats par approche moléculaire (séquençage de l'ADNr 16S).

La figure 15 montre le regroupement des 189 souches sur la base de leurs propriétés phénotypiques. Au total, la collection de bactéries halophiles est composée de 26 genres différents avec 51 espèces et 46 souches non identifiées en termess d'espèces. L'analyse des résultats montre la prédominance de bactéries appartenant au genre *Pedobacter, Pelagicoccus, Puniceicoccus* en tant que représentants du groupe à Gram négatif. Les bactéries Gram positifs sont dominées par les genres *Bacillus, Staphylococcus et Lentibacillus*. L'analyse des données montre que le site 1 présente une biodiversité bactérienne riche par rapport aux sites 2 et 3. En effet, 25 genres ont été identifiés dans le site 1 (région de Fès) pour 11 et 4 genres pour les sites 2 et 3 (région de Taza), respectivement. Le site 1 est caractérisé par la présence de 48 espèces différentes dont 18 espèces appartiennent au genre le plus dominant *Bacillus.* Cependant 40 souches n'ont pas pu être identifées en termes d'espèces. Les sites 2 et 3 présentent 20 et 7 espèces différentes, respectivement. Cette richesse de biodiversité bactérienne du site 1 par rapport aux deux autres sites est probablement dûe à sa proximité aux champs de culture de blé et d'oliviers connus pour leur richesse en micro-organismes. L'irrigation aisin que les eaux pluviales peuvent drainer ces micro-organismes de ces champs de cultures vers le site 1.


Pelagicoccus litoralis 63SS1
Cerasicoccus sp. 53WMS1
Pelagicoccus mobilis 115SS2
Bacillus subitlis 810SS1
Pedobacter suwonensis 182MS1
Lentibacillus juripiscarius 981WMS1
Oceanobacillus sp. 166WMS2
Halorubrum sp. 56WMS1
Bacillus selenitirenducens 57WMS1
Halomonas elongata 165WMS2
Salinibacterium sp. 104SS2
Bacillus sp. 43SS1
Bacillus endophyticus 177MS1
Pelagicoccus mobilis 54WMS3
Jeotgalicoccus sp. 180MS1
Salinicoccus sp. 29SSS1
Pedobacter suwonensis 154SS1
Pelagicoccus croceus 149SS1
Puniceicoccus sp. 150SS1
Bacillus safensis 110SS2
Ureibacillus sp. 152SS1
Bacillus sp. 87MS1
Puniceicossu sp. 189SS2
Bacillus selenitireducens 65SS1
Ureibacillus sp. 85SS1
Bacillus safensis 109MS1
Halorubrum sp. 72SS1
Gemella sp. 1092SS1
Brevibacterium sp. 25MS1
Exiguobacterium sp. 41SS1
Pedobacter suwonensis 107MS1
Brevibacterium sp. 103SS1
Bacillus safensis 105MS1
Bacillus safensis 31SS1
Pedobacter suwonensis 60SS1
Marinococcus albus 18SS1
Marinococcus albus 64SS1
Ureibacillus sp. 159MS1
Oceanobacillus sp. 1040SS2
Bacillus sp. 168MS1
Puniceicoccus sp. 161MS1
Oceanobacillus sp. 187SS2
Bacillus pseudomycoide 113MS3
Staphylococcus sp. 1031MS1
Bacillus thermoamylovorans 681MS1
Pedobacter saltans 167WMS2
Oceanobacillus oncorhynchi 47SS1
Pelagicoccus mobilis 83SS1
Bacillus pseudomycoide 48SS1
Exiguobacterium sp. 14SS1
Puniceicoccus sp. 196MS1
Bacillus tequilensis 6MS1
Lentibacillus juripiscarius 123MS1
Bacillus velezensis 15SSS1
Pedobacter suwonensis 91MS2
Bacillus halotolerans 16SS1
Bacillus sp. 682MS1
Staphylococcus lentus 13SS1
Pedobacter suwonensis 162WMS2
Bacillus subtilis 117MS2
Bacillus sp. 7MS1
Pelagicoccis mobilis 185WMS3
Bacillus thermoamylovorans 69SS1
5
4
3
2
1
0


Bacillus thermoamylovorans 69SS1
Bacillus atrophaeus 402MS2
Puniceicoccus sp. 160MS1
Salinibacterium sp. 169MS1
Oceanobacillus picturae 55SSS1
Pelagicoccis litoralis 203WMS2
Bacillus selenitireducens 191SS2
Pedobacter suwonensis 190SS2
Marinilabilia sp. 97SS1
Brevibacterium permense 19SS1
Bacillus selenitireducens 882MS2
Ureibacillus sp. 71SS1
Ureibacillus sp. 134WMS3
Pelagicoccus litoralis 32SS1
Bacillus indicus 881MS1
Bacillus endophyticus 40MS1
Oceanobacillus sp. 122MS1
Bacillus endophyticus 74SS1
Bacillus velezensis 35SS1
Bacillus subtilis 197WMS3
Pelagicoccus croceus 89MS2
Ulvibacter sp. 49SS1
Marinilabilia sp. 96SS1
Sandarakinotal sp. 114SS2
Marinococcus albus 62SS2
Bacillus selenitireducens 982WMS1
Planomicrobium sp. 401SS3
Puniceicoccus sp. 207WMS2
Sandarakinotal sp. 112MS1
Bacillus endophyticus 158WMS3
Marinococcus albus 153SS1
Lentibacillus juripiscarius 108MS1
Ureibacillus sp. 20SS1
Salinibacterium sp. 37SS1
Bacillus selenitireducens 100MS1
Bacillus sp. 42WMS1
Ureibacillus sp. 111MS1
Bacillus endophyticus 28SSS1
Gemella sp. 184MS1
Bacillus indicus 1011WMS2
Pedobacter suwonensis 128SSS1
Bacillus safensis 26SSS1
Pelagicoccus mobilis 59SS1
Bacillus halodurans 66SS1
Sandarakinotal sp. 84SS1
Puniceicoccus sp. 61WMS2
Sandarakinotal sp. 92MS2
Bacillus endophyticus 4SS1
Bacillus safensis 400SS1
Staphylococcus sp. 1091SS1
Bacillus thermoamylovorans 195MS1
Bacillus halodurans 27SSS1
Pedobacter suwonensis 209MS1
Halomonas sp. 228SS1
Brevibacterium samyangense 52WMS1
Lentilbacillus juripiscarius 46SS1
Bacillus pseudomycoide 80SS1
Puniceicoccus sp. 73SS1
Lentibacillus juripiscarius
Bacillus endophyticus 142MS1
Bacillus atrophaeus 30SS1
Halobacillus sp. 141SS1
Bacillus safensis 1020SS3
Sandarakinotal sp. 135MS1
Cerasicoccus sp. 140SS1
Bacillus halotolerans 101SS2
Pelagicoccus croceus 132SSS1
Halorubrum sp. 133SSS1

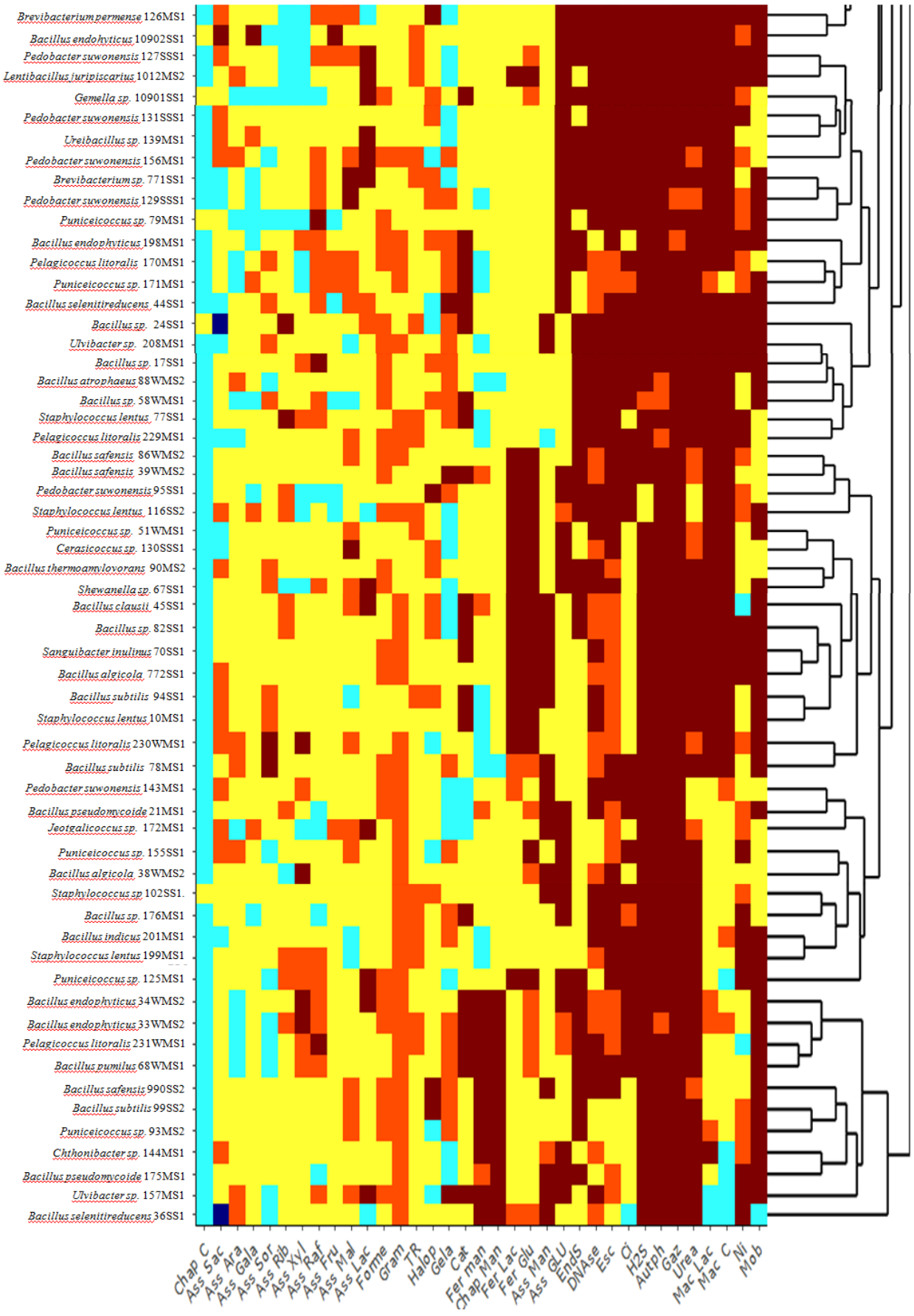


Figure 15. Regroupement des isolats en fonction de 35 caractéristiques phénotypiques. L'échelle des valeurs de 0 à 5 indique la magnitude de la réponse au test.

13 genres ont été isolées uniquement à partir du Site 1. Il s'agit de *Chthonibacter*,, *Mariniabilia, Halobacillus, Salinococcus, Cerasicoccus, Ulvibacter, Halorubrum, Jeatgalicoccus, Brevibacterium, Sanguibacter, Shewanella, Exiguobacterium* et *Gemella*. Le genre *Planomicrobium* est présente uniquement dans le site 3.

Tableau 11. Distribution des différents genres montrant de l'activité hydrolytique selon les trois sites d'isolement.

Genres/Espèces	Nombre Total d'isolats	Nombre par Site		
		Site 1	Site 2	Site 3
Bacillus spp	72	51	17	4
Pedobacter spp	17	12	4	0
Pelagicoccus spp	15	10	3	2
Puniceicoccus spp	13	10	4	0
Ureibacillus spp	8	7	0	1
Staphylococcus spp	8	7	1	0
Lentibacillus spp	6	5	1	0
Brevibacterium spp	6	6	0	0
Oceanobacillus spp	6	3	3	0
Sandarakinotalea spp	5	3	2	0
Marinicoccus spp	4	3	1	0
Gemella spp	3	3	0	0
Salinibacterium spp	3	2	1	0
Halorubrum spp	3	3	0	0
Cerasicoccus spp	3	3	0	0
Ulvibacter spp	3	3	0	0
Halomonas spp	2	1	1	0
Jeatgalicoccus spp	2	2	0	0
Marinilabilia spp	2	2	0	0
Exiguobacterium spp	2	2	0	0
Salinicoccus spp	1	1	0	0
Planomicrobium spp	1	0	0	1
Chthonibacter spp	1	1	0	0
Halobacillus spp	1	1	0	0
Sanguibacter spp	1	1	0	0
Shewanella spp	1	1	0	0
Total	189	143	38	8

5. Etude phylogénétique

La parenté phylogénétique comparative préliminaire du groupe sélectionné de bactéries halophiles ayant une production assez importante d'enzymes hydrolytiques a été réalisée sur la base du gène d'ADNr 16S d'une taille de 1420 pb avec ceux repertoriés dans la banque des gènes NBCI.

Les numéros d'accès des séquences des souches utilisées comme références sont extraites de la base de données GenBank et sont regroupés dans le tableau A3 de l'Annexe 1.

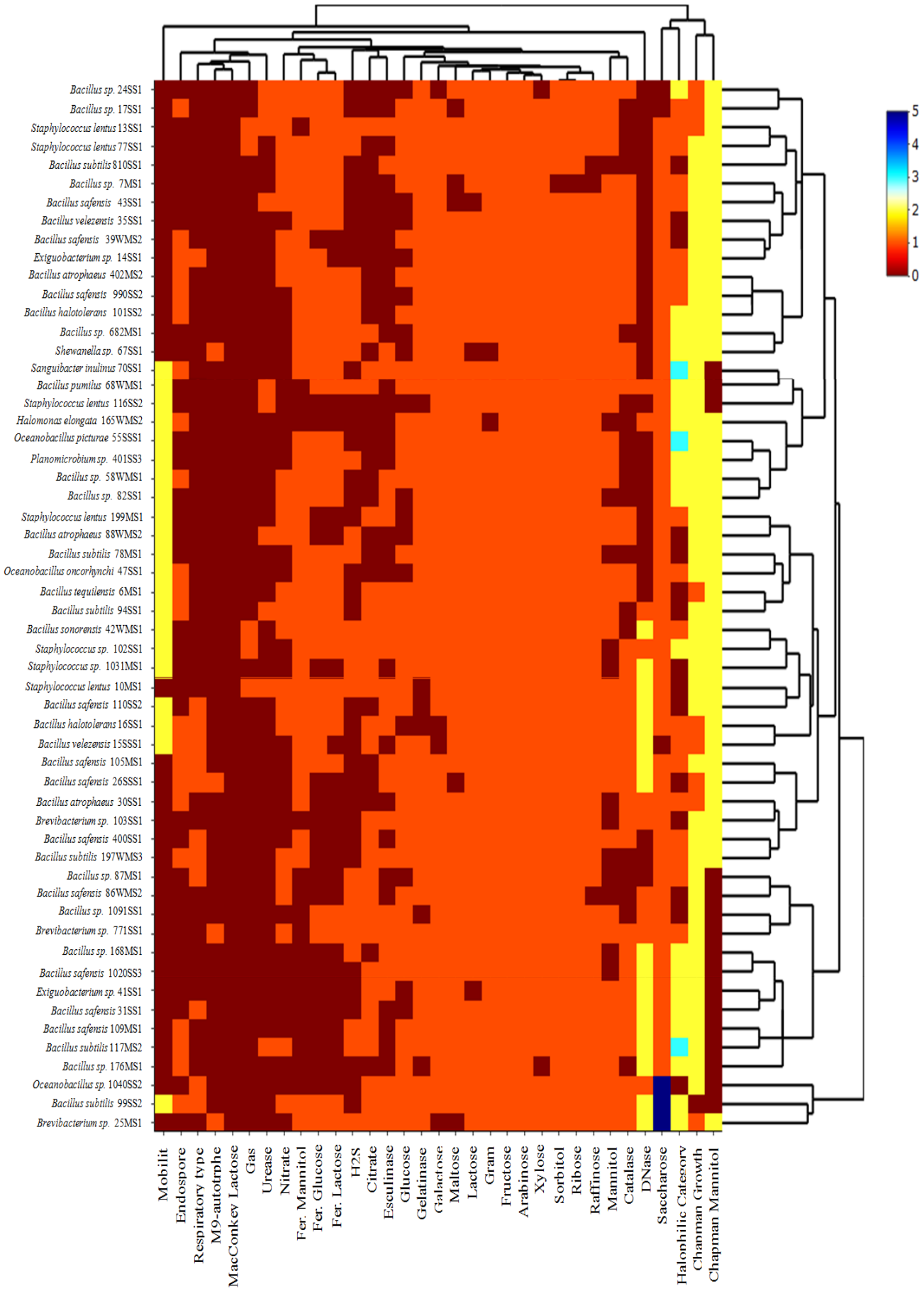


Figure 16. Regroupement des 56 souches séquencées en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques. L'échelle des valeurs de 0 à 5 indique la magnitude de la réponse au test.

On a choisi 56 souches pour leurs activités enzymatiques. Le séquençage de l'ADNr 16S nous a permis d'avoir 49 séquences complètes d'environ 1.4 kpb alors que la séquence des 7 autres souches est incomplète. Les 49 séquences du gène codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomal des 56 souches de la collection obtenue lors de cette étude, ont été déposées dans la banque « GenBank » sous les numéros d'accès de MK713683 à MK713732. La Figure 16 montre le regroupement des 56 souches sur la base de leurs propriétés phénotypiques.

Les données obtenues à partir de l'analyse phylogénétique nous ont amenés à classer les isolats dans neuf genres : *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium*, *Shewanella*, *Oceanobacillus*, *Planomicrobium*, *Exiguobacterium*, *Sanguibacter* et *Halomonas*.

Nous avons appliqué les critères Neigbour-Joining et obtenu un arbre phylogénétique, regroupant les 56 séquences en huit groupes (A-H), représenté dans la Figure 17.

Le groupe A, représenté par les souches du genre *Bacillus*, est le groupe dominant (36 souches). Dans le cas de l'arbre phylogénétique construit avec l'espèce de *Bacillus*, nous avons trouvé 12 sous-groupes (A1-A12) comme représenté dans la figure 18 qui montre la sous-arborescence de jonction des voisins de ce groupe. *Bacillus safensis* constitue les principales souches (27,77%) de ce groupe, suivies des souches attribuées à *Bacillus subtilis* (16,66%), *Bacillus atrophaeus* (8,33%) *Bacillus velezensis* (5,55%) et *Bacillus halotolerans* (5,33%). 12 séquences d'ADNr 16S n'ont pas réussi à attribuer les souches au niveau de l'espèce. Les souches *Bacillus tequilensis, Bacillus velezensis, Bacillus clausii* et *Bacillus halodurans* n'ont été isolées que du site 1.

Les séquences du gène ADNr 16S des souches *Bacillus* sp. 7MS1 (MK713705), *Bacillus* sp. 682MS1 (MK713707) et *Bacillus* sp. 176MS1 (MK713714) ont montré une identité de moins de 98% avec d'autres souches apparentées. Bien que leurs séquences d'ADNr 16S soient très similaires, différentes souches isolées dans le genre *Bacillus*, ont présenté des caractéristiques biochimiques différentes, que ce soit en les comparant entre elles ou avec d'autres souches de type apparentées phylogénétiquement, ce même constat est décrit par Fox et *al.*, 1992.

Le groupe B est représenté par les souches du genre *Staphylococcus*. C'est le deuxième genre dominant des sites étudiés. Il consiste principalement en des souches de *Staphylococcus lentus* présentant une diversité remarquable dans leurs caractéristiques biochimiques, principalement leurs activités d'enzymes hydrolases. 8 souches de *Staphylococcus* se sont révélées en grande partie halotolérantes en supportant des concentrations de NaCl de 0 à 300 g/l. Marquez et *al.*, 1987 ont isolé, d'une mine de sel en Espagne, plusieurs micro-organismes (564 isolats). Les bactéries appartenant au genre *Staphylococcus* font partie pour la majorité de la catégorie halotolérantes (75 isolats) et de la catégorie d'origine marine (8 isolats).

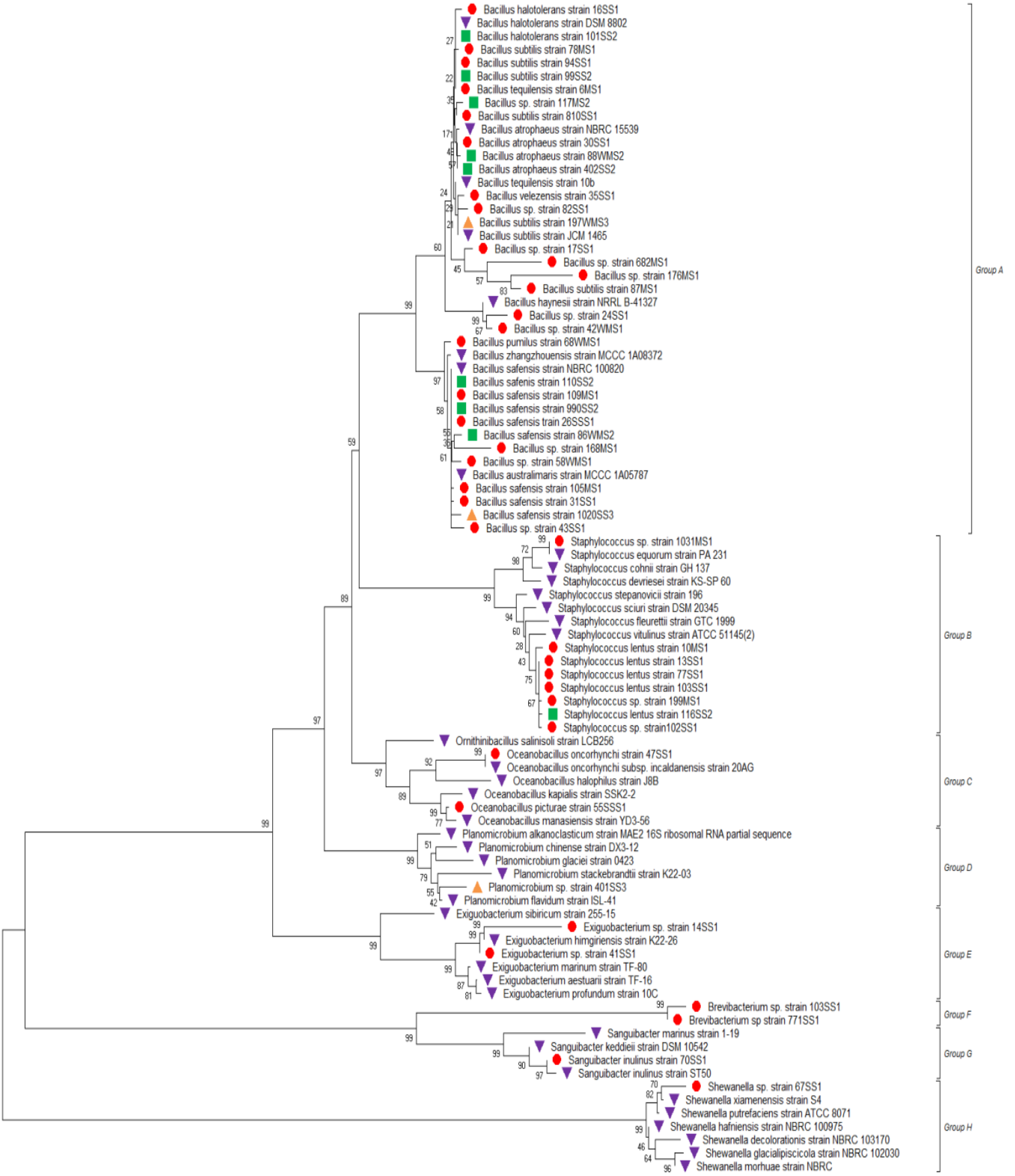


Figure 17. Arbre phylogénétique moléculaire des 56 bactéries halophiles à forte activité enzymatique : ● souches du site 1, ▲souches du site 2, ■ souches du site 3 et ▼ souches références utilisées. Les distances des branches des arbres représentent le taux de substitution des nucléotides et la barre d'échelle représente le nombre attendu de changements par position homologue de nucléotide.

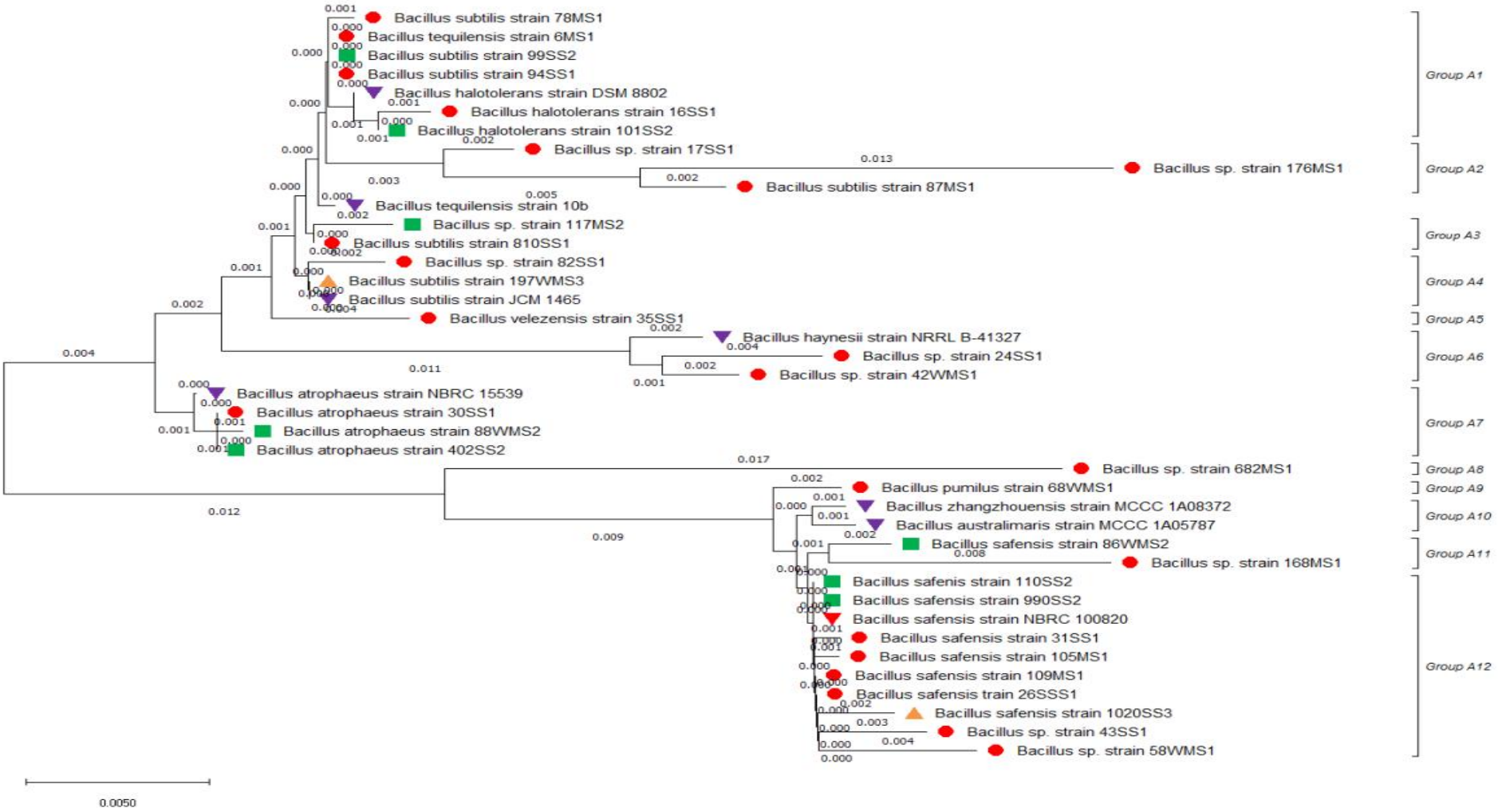


Figure 18. Arbre phylogénétique moléculaire joignant les voisins de séquences d'ADNr 16S de diverses bactéries halophiles du groupe A. Avec : ● souches du site 1, ▲souches du site 2 et ■ souches du site 3 et ▼souches références utilisées. Les distances des branches des arbres représentent le taux de substitution des nucléotides et la barre d'échelle représente le nombre attendu de changements par position homologue de nucléotide.

Le groupe C est représenté par trois souches identifiées comme appartenant au genre *Oceanobacillus*. Les souches *Oceanobacillus oncorhynchi* 47SS1 et *Oceanobacillus picturae* 55SSS1 ont été isolées du site 1 et ont montré une différence de réponse à la concentration en sel avec des intervalles de tolérance au sel de 10-210 g/l et 150-210 g/l, respectivement. *Oceanobacillus* sp. 1040SS2 isolée du site 2 a été caractérisée comme une bactérie halotolérante présentant une plage étendue de tolérance au sel de 0 à 270 g/l.

Une espèce identifiée comme *Planomicrobium* sp. 401SS3 isolée du site 3 est le seul représentant du groupe D. La souche 401SS3 a montré un profil halophile avec une plage optimale de croissance de 30 à 210 g/l de NaCl. Des membres halotolérants du genre *Planomicrobium* ont été signalés dans des spécimens apparentés au milieu marin tels que les fruits de mer, les sédiments côtiers et la banquise antarctique, et ils présentent une tolérance à NaCl de de 0 à 140 g/l (Yoon et *al.*, 2015).

Le groupe E est représenté par deux espèces du genre *Exiguobacterium*. Ce genre a été largement décrit comme un groupe diversifié qui se trouve dans des habitats différents, mais moins dans des environnements salins (Oren, 2015; Ventosa et *al.*, 2015 ; Remonsellez et *al.*, 2018). Les résultats concernant l'analyse phénotypique et phylogénétique du phylotype représenté par deux souches, *Exiguobacterium* sp. 14SS1 (MK713684) et *Exiguobacterium* sp. 41SS1 (MK713691), a montré qu'une tolérance au sel plus élevée est présente dans la plage de 10-180 g/l et 30-180 g/l, respectivement, comme indiqué dans d'autres travaux pour les souches de ce genre (Romensellez et *al.*, 2018).

Les brévibactéries ont été isolées de plusieurs habitats, en particulier de milieux à forte concentration de sel, tels que l'eau de mer et des échantillons de sédiments (Küster & Williams, 1964 ; Lee, 2008). Le genre *Brevibacterium* (groupe F) est représenté par trois espèces désignées, *Brevibacterium* sp. 103SS1, *Brevibacterium* sp. 771SS1 et *Brevibacterium* sp. 25MS1, isolés seulement du site 1. En ce qui concerne les plages de tolérance au NaCl, les souches de *Brevibacterium* décrites ci-dessus tolèrent des valeurs allant de 0 à 120 g/l, 10 à 90 g/l, 30 à 210 g/l par rapport à la tolérance au NaCl des souches types de ce genre, allant de 50 à 180 g/l (Trujillo et *al.*, 2015).

La souche 70SS1 de *Sanguibacter inulinus* est la seule représentante du groupe G. Elle présente une tolérance au sel légèrement élevée, allant de 150 à 210 g/l, ce qui permet de la qualifier d'halophile extrême. Les données concernant les bactéries halophiles de ce genre sont rares et certaines espèces sont décrites comme légèrement halotolérantes, avec une plage de tolérance de 0 à 70 g/l de NaCl (Huang et *al.*, 2005 ; Ramos et *al.*, 2015). Notre souche 70SS1 identifiée en tant que *Sanguibacter inumilus* et isolée du site 1 est la première espèce décrite comme halophile extrême.

Le groupe H est représenté par *Shewanella* sp. 67SS1, isolée du site 1. Elle présente une

large plage de tolérance au NaCl de 30 à 210 g/l, contrairement à la plupart des espèces décrites de ce genre, qui sont légèrement halotolérantes avec une tolérance moyenne au NaCl allant de 0 à 60 g/l (Bowman et *al.,* 2015). En règle générale, les espèces de *Shewanella* ont été décrites comme strictement marines et plusieurs espèces de ce genre ont été isolées de divers habitats salins, notamment des marais salants, à partir d'algues marines ou d'eau de mer et de produits alimentaires salés (Simidu et *al.,* 1990 ; Rosselló-Mora et *al.,* 1994 ; Vogel et *al.,* 1997).

Les données montrent que les regroupements de données phylogénétiques et phénotypiques ont donné des résultats divergents, indiquant ainsi une diversité remarquable au sein des souches isolées de ce travail.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude est la permière de la région Fès-Meknès et l'une des première au Maroc qui contribué à améliorer nos connaissances sur de nouveaux biotopes hypersalins naturels et artificiels. Cette étude contribuée également à appréhender la biodiversité bactérienne halophile de tels environnements extrême.

Ce qui nous a permis d'obtenir une collection bactérienne de 227 isolats. En termes d'halophilie, la collection otenue est composée de bactéries :

- Halophile modérée : 40%,
- Halophile légère : 32%,
- Halotolérante : 15.5% et
- Halophile extrême : 8.5%.

Ce qui indique que les environnements hypersalins abritent un nombre important de consortia de bactéries halophiles partageant différentes tolérances ou besoins en NaCl. L'intéraction entre ces différentes bactéries halophiles pourrait être un axe de recherche à exploiter pour mieux comprendre cette biodiversité halophiles et sa distribution.

Dans notre collection bactérienne d'halophiles, 37.5% d'entres elles sont dotée de pigment (jaune, orange et rose). Les pigments de bactéries ou micro-organismes halophiles sont largement étudiés pour leurs potentiels biotechnologie très diverses. Une recherche sur les biomolécules responsables des pigments des souches de notre collection est un autre axe de valorisation de ces bactéries halophiles.

Cette collection a été identifée par approche biochimique et moléculaire. Lors de l'approche moléculaire, la technique d'extraction de l'ADN qui est relativement simple et rapide à permis l'extraction de l'ADN de bactérie à Gram positifs et négatifs qui démontre de l'efficacité de la méthode.

L'identification a permis d'obtenir 26 genres différents, ce qui révèle une grande diversité de bactéries halophiles dans les environnements hypersalins. Cette diversité est plus prononcée dans le site naturel (Site 1) avec 25 genres isolés, contrairement aux sites artificiels (sites 2 et 3) qui dénombrent 11 et 4 genres isolés, respectivement. Nous avons montré que 13 genres sont isolés uniquement du site 1 alors qu'un seul genre *Planomicrobium* n'est isolé que du site 3.

Certaines souches de notre collection bactérienne ont montrées une résistance à plusieurs antibiotiques ce qui montre qu'elles sont potentiellement des réservoirs de gène de résistance à certains antibiotiques. Qui est une autre perspective de valorisation des bactéries halophiles et une volet de recherche à appronfondir.

Certains genres sont décrits pour la première fois comme halophiles extrêmes notamment *sanguibacter inulinus, Pelagicoccus litorali* et *Oceanobacillus picturae.* Diop et *al., (*2016) ont isolé une souche d'*Oceanobacillus picturae* halophile modérée à partir du sel de table dont la marge de NaCl pour la croissance est comprise entre 75 et 150 g/l. Le genre *Shewanella* est isolé d'environnements marins et pour la première fois isolée, grâce à ce travail, de biotope terreste. Une étude génétique plus approfondie des ces genres bactériens halophiles ayant des caractéristiques différentes de celle précédement isolés et décrites dans la bibliographie, pourrais contribuer à mieux comprendre leurs évolutions dans différents milieux hypersalins.

Chapitre 3

Criblage des Activités Hydrolytiques de Bactéries Halophiles

INTRODUCTION

Les hydrolases constituent une classe d'enzymes largement réparties dans la nature, des bactéries aux eucaryotes supérieurs, mais seulement une fraction du monde microbien terrestre a été explorée commercialement. Plus de 3000 enzymes différentes ont été criblées et caractérisées à partir d'organismes mésophiles (Horikoshi et *al.,* 2011). Les tentatives de criblage et de caractérisation d'enzymes provenant d'organismes extrêmophiles sont beaucoup moins fréquentes, bien que ces dix dernières années, plusieurs études aient été réalisées dans des habitats extrêmes (salins), afin d'isoler et de caractériser de nouvelles activités enzymatiques ayant des propriétés différentes de celles des enzymes classiques.

Les recherches se sont intensifiées avec le temps, pour les nombreux avantages des extrêmozymes. La biocatalyse provenant d'extrêmozymes contribue à combler le fossé entre les processus chimiques et biologiques. De plus, la culture est relativement plus facile et les risques de contamination lors de la production à grande échelle seraient fortement minimisés. Cela permet aussi de valoriser les bactéries halophiles et leurs écosystèmes.

Le potentiel biotechnologique des micro-organismes d'environnements hypersalins au Maroc n'est que trop peu exploré. C'est l'objectif de ce chapitre qui consiste dans le criblage de bactéries dotées d'activités enzymatiques, parmi les plus réputées et étudiées comme applicables dans de nombreuses et diverses industries, notamment : cellulase, amylase, pectinase, protéase et inulinase. Les amylases et protéases peuvent être utilisées pour le traitement des eaux usées, dans les lessives et dans les détergents mais aussi dans l'agro-alimentaire (Liu et *al.,* 2019). Les cellulases ont plusieurs applications dans les biotechnologies vertes, surtout pour la production de biocarburants et processus de bioremédiation, elles peuvent aussi être utilisées dans l'agroalimentaire pour la trituration de l'huile d'olive (Di Donato et *al.,* 2018). Les pectinases sont déjà largement utilisées dans l'industrie alimentaire pour la clarification de jus (Mohandas et *al.,* 2018), elles ont en plus une application potentielle dans d'autres domaines de l'industrie alimentaire et dans la production de biofuels. Les inulinases font partie des enzymes non valorisées malgré leurs applications connues pour la production de probiotiques, de fructose et bioéthanol (Hamedi et *al.,* 2015).

Les résultats obtenus visent à démontrer le large éventail d'activités à potentiel biotechnologique présentées par les bactéries vivant dans quelques biotopes hypersalins de la région de Fès-Meknès et à renforcer l'importance du criblage d'environnements extrêmes vierges pour la découverte de molécules bioactives intéressantes ou nouvelles.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'activité enzymatique des isolats a été révélée qualitativement sur milieu sélectif gélosé additionné de différentes concentrations en sel allant de 0% à 33% (p/v) (0 à 5.5 M) et selon la croissance des isolats testés, pour évaluer à quelle concentration en NaCl ces isolats sont dotés d'activité. L'Annexe 2 comporte la composition de tous les milieux et réactifs utilisés.

1. Révélation de l'activité qualitative

1.1. Révélation de l'activité amylase

L'activité de l'amylase a été déterminée qualitativement sur un milieu M9 additionné de 0.5% (p/v) d'amidon soluble. L'incubation se fait à 37°C pendant 72h. Pour s'assurer de la bonne lecture de l'activité, des témoins ont été utilisés, *Dickeya solani* IP2222 et *Escherichia coli* K12 comme témoins négatifs. L'activité a été révélée à l'aide d'un réactif à l'iode (solution commerciale KI à 0.01 M). La présence d'un halo clair autour des colonies indique la présence de l'activité amylase (Mishra & Behera, 2008).

1.2. Révélation de l'activité cellulase (CMCase)

L'activité CMCase a été révélée sur milieu M9 additionnée à 0.5% (p/v) de CMC. Les témoins utilisés sont *Dickeya solani* IP2222 comme témoin positif et *Escherichia coli* K12 comme témoin négatif. Les boîtes Petri ensemencées sont incubées à 37°C pendant 72h. La mise en évidence est effectuée par l'inondation des cultures d'une solution, soit de Rouge Congo à 0.1% (p/v) pendant 15 à 20 min puis par un rinçage avec une solution de NaCl à 1.0 M, soit de lugol pendant 15 à 20 min. L'apparition de zones claires autour des colonies pour le lugol ou d'un halo jaune pour le Rouge Congo, est un résultat positif indiquant la présence de l'activité CMCase (Gohel et *al.*, 2014).

1.3. Révélation de l'activité pectinase

L'activité Pectinase des souches a été révélée sur deux milieux: M9 additionnée de 0.5% (p/v) de pectine de pomme et M9 additionnée de 0.5% (p/v) de PGA. Des témoins ont été utilisés, *Dickeya solani* IP2222 comme témoin positif et *Escherichia coli* K12 comme témoin négatif. Les boîtes Petri sont incubées à 37°C pendant 72h. La mise en évidence est effectuée par inondation des cultures d'une solution de révélation d'acétate de cuivre à 7.5% (p/v) pendant 15 à 20 min ou d'une solution de lugol pendant 15 à 20 min. L'apparition de zones claires autour des colonies est un résultat positif indiquant la présence de l'activité pectinase (Hankin et *al.,* 1971).

1.4. Révélation de l'activité protéase

L'activité protéolytique des souches a été révélée sur deux milieux: M9 additionnée de 0.5% (p/v) de poudre de lait pasteurisé et M9 additionnée de 0.5% (v/v) de lait écrémé pasteurisé. Des témoins ont été utilisés, *Dickeya solani* IP2222 comme témoin positif et *Escherichia coli* K12 comme témoin négatif. Les boîtes Petri ensemencées sont incubées à 37°C pendant 7 jours. Les

zones claires qui apparaissent autour des colonies après incubation mettent en évidence la présence de protéase (Dingle et *al.*, 1953).

1.5. Révélation de l'activité inulinase

L'activité inulinase des souches a été révélée sur le milieu M9 additionnée de 0.5% (p/v) d'inuline. *Escherichia coli* K12 à été utilisé comme témoin négatif. Les boites sont incubées à 37°C pendant 72h. La croissance sur le milieu est signe de la présence de l'activité inulinase. Pour confirmer, on inonde les cultures de solution de lugol et les isolats dotés d'un halo clair autour des colonies sont inulinases positives (Li et *al.*, 2011).

2. Détermintation de l'activité quantitative

2.1. Préparation de l'échantillon à doser

Les isolats sont mis en culture dans un milieu liquide M9 contenant (i) la concentration en NaCl selon la catégorie d'halophilisme de l'isolat (faiblement et halotolérants (1% ≡ 0.2 M NaCl), modéré (6% (p/v) ≡ 1.0 M NaCl) ou extrêmes (15% (p/v) ≡ 2.5 M NaCl)) et (ii) le substrat spécifique à l'activité recherché. Les isolats sont incubés à 37°C sous agitation de 140 rpm. Les prélèvements sont effectués après 24 h et les cultures sont centrifugées à 10000 *g* pendant 10 min à 4°C. Le dosage des sucres réducteurs est utilisé pour révéler l'activité CMCase, amylase, pectinase et inulinase alors que l'activité protéase est révélée par le dosage de la tyrosine. En parallèle au dosage, la croissance bactérienne (DO_{600} nm) a été déterminée ainsi que la quantité des protéines totales.

2.2. Dosage des sucres réducteurs

2.2.1. Le principe

Le dosage de l'activité amylase, cellulase, pectinase et inulinase est réalisé selon la méthode décrite par Miller (1956), qui se base sur l'utilisation de l'acide dinitrosalicylique (DNS). Cette technique est un moyen de détermination de la teneur en sucres réducteurs libres présents dans les échantillons à doser. La dégradation du substrat (l'amidon, le CMC, la pectine et l'inuline) libère des sucres réducteurs (le maltose, le glucose, l'acide galacturonique et le fructose). A chaud et en milieu alcalin, le DNS est réduit en acide 3-amino 5-nitrosalicylique, un composé de différentes intensités de couleur rouge dosable à l'aide du spectrophotomètre à 540 nm (Figure 19). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du sucre libéré présent dans le milieu réactionnel à des conditions physico-chimique constantes.

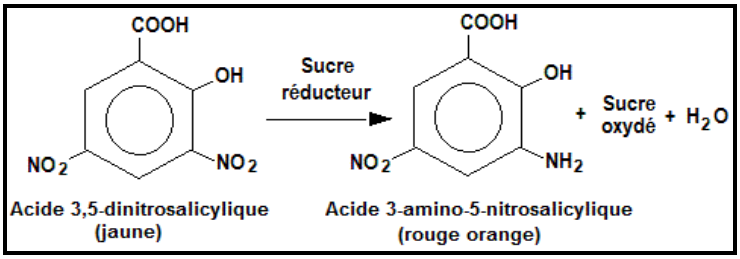


Figure 19. Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode utilisant le DNS.

2.2.2. Le protocole de dosage

Le surnageant d'une culture bactérienne est utilisé pour le dosage et la quantification des sucres libérés. 0.5 ml de surnageant sont additionnés à 0.5 ml du substrat (amidon, CMC, pectine, PGA ou inuline à 2.0% (p/v)) et à 0.5 ml de tampon acétate de sodium, pH= 4.8. Pour le test blanc, le surnageant est remplacé par du tampon acétate de sodium. L'ensemble des tubes est incubé à 50°C pendant 30 min, ensuite 1.5 ml du réactif DNS est ajouté dans chaque tube avant de les porter à ébullition à 100°C pendant 5 min. Pour savoir la quantité de sucres réducteurs déjà présente dans le surnageant suite à la croissance 0.5 ml du surnagent sont ajoutés à 0.5 ml de tampon acétate de sodium pH 4.8 auquels est additionné directement 1.0 ml de DNS, porté à ébullition (100°C) pendant 5 minutes. Le mélange réactionnel est refroidi pendant 5 à 10 min, puis la lecture de la DO est réalisée à 540 nm. L'unité internationale de l'activité enzymatique étudiée est définie comme la quantité d'enzyme qui libère une micromole du sucre réduit par une minute (Ghose, 1987). Le calcule de l'activité enzymatique en unité internationale (U) se fait comme suit :

$$\textbf{Activité enzymatique en µmol /min/ ml} = \frac{\textbf{Sucre Réducteur libéré(mg)}}{\textbf{PM} \times \textbf{T X V}}$$

Avec :

- PM mg/µmol : la masse molaire du sucre réducteur.
- V = volume de surnageant (0.5 ml)
- T = Temps de la réaction (30 min)

2.2.3. Préparation des courbes d'étalonnages

Les gammes étalons sont réalisées à partir de solutions mères de maltose, de glucose, de fructose et d'acide galacturonique dont les concentrations varient, comme l'indique les tableaux suivants (Tableaux 12 à 15). Les courbes des gammes étalons sont présentées dans l'Annexe 2. Plusieurs solutions mères sont préparées pour chaque concentration testée, pour éviter l'ajoute du volume d'eau et pour que le dosage et la gamme étalon soit dans les mêmes conditions:

Tableau 12. Préparation de la gamme étalon du maltose :

Quantité de maltose (mg)	0	0.250	0.500	0.750	1.0
Volume de maltose (concentration de la solution stock)	0	0.5 ml de 0.5 mg/ml	0.5 ml de 1.0 mg/ml	0.5 ml de 1.5 mg/ml	0.5 ml de 2.0 mg/ml
Volume du tampon acétate à 0.2 M, pH=4.8 (ml)	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5
Volume du réactif DNS (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Incubation 5 minutes à 100°C et lecture de la DO à 540 nm					

Tableau 13. Préparation de la gamme étalon du glucose :

Quantité de glucose (mg)	0	0.250	0.500	0.750	1.0
Volume de glucose et la concentration de la solution stock	0	0.5 ml de 0.5 mg/ml	0.5 ml de 1.0 mg/ml	0.5 ml de 1.5 mg/ml	0,5 ml de 2.0 mg/ml
Volume du tampon acétate à 0.2 M, pH=4.8 (ml)	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5
Volume du réactif DNS (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Incubation 5 minutes à 100°C et lecture de la DO à 540 nm					

Tableau 14. Préparation de la gamme étalon de l'acide galacturonique :

Quantité d'acide galacturonique (mg)	0	0.250	0.500	0.750	1.0
Volume d'acide galacturonique et la concentration de la solution stock	0	0.5 ml de 0.5 mg/ml	0.5 ml de 1.0 mg/ml	0.5 ml de 1.5 mg/ml	0.5 ml de 2.0 mg/ml
Volume du tampon acétate à 0.2 M, pH=4.8 (ml)	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5
Volume du réactif DNS (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Incubation 5 minutes à 100°C et lecture de la DO à 540 nm					

Tableau 15. Préparation de la gamme étalon du fructose :

Quantité de fructose (mg)	0	0.250	0.500	0.750	1.0
Volume de fructose et la concentration de la solution stock	0	0.5 ml de 0.5 mg/ml	0.5 ml de 1.0 mg/ml	0.5 ml de 1.5 mg/ml	0.5 ml de 2.0 mg/ml
Volume du tampon acétate à 0.2 M, pH=4.8 (ml)	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5
Volume du réactif DNS (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Incubation 5 minutes à 100°C et lecture de la DO à 540 nm					

2.3. Activité protéase : dosage de la tyrosine

2.3.1. Le principe

Le dosage de l'activité protéase est réalisé selon la méthode décrite par Hagihara (1958), cette méthode de dosage repose sur la propriété qu'ont les acides aminés aromatiques (tyrosine) d'absorber de la lumière dans l'ultraviolet. Les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines et des polypeptides en libérant des acides aminés libres et des peptides simples, qui se trouvent dans la phase soluble. Les molécules non hydrolysées sont précipitées par le TCA. La tyrosine est un acide aminé présent dans toutes les protéines que l'on utilise comme standard. La température et le pH doivent être fixes. Une augmentation de la température est à l'origine d'une diminution de la fluorescence et les pH doivent être neutres pour éviter l'agrégation des protéines entraînant une augmentation de la fluorescence. Le pique d'absorbance de la tyrosine est à 280 nm.

2.3.2. Le protocole de dosage

Le surnageant d'une culture bactérienne d'un volume de 0.5 ml est additionné à 2.5 ml de Solution de Caséine, puis incubé à 37°C pendant 20 minutes. L'arrêt de la réaction se fait par l'ajout de 3.0 ml de TCA. Ensuite le tout est incubé à température ambiante pendant 20 minutes, puis

centrifugé 10 min à 10 000g. Le surnageant obtenu est dosé à 280 nm. Une unité d'activité protéase est définie comme la quantité d'enzyme qui donne une valeur d'absorbance équivalente à 1 mg de tyrosine par minute dans ces conditions expérimentales.

2.3.3. Préparation de la courbe d'étalonnage

La gamme étalon de tyrosine est préparée à partir de plusieurs solutions mères de tyrosine, puis des dilutions sont effectuées comme l'indique le tableau 16. La courbe d'étalonnage est présentée dans l'Annexe 2.

Tableau 16. Préparation de la gamme étalon de tyrosine :

Quantité de Tyrosine (mg)	0	0.250	0.500	0.750	1.0
Volume de Tyrosine (concentration de la solution stock)	0	0.5 ml de 0.5 mg/ml	0.5 ml de 1.0 mg/ml	0.5 ml de 1.5 mg/ml	0.5 ml de 2.0 mg/ml
Volume de TCA (ml)	3	3.0	3.0	3.0	3.0
Incubation 20 minutes à température ambiante et lecture de la DO à 280 nm					

3. Dosage des protéines

3.1. Le principe

Les protéines sont composées d'acides aminés et beaucoup des méthodes de dosage des protéines utilisent les propriétés des acides aminés. Parmi les méthodes, celle au bleu de Coomassie G250 décrite par Bradford (1976). En milieu méthanolique, ce colorant s'adsorbe sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'adsorption qui passe du rouge au bleu. Cette adsorption se fait principalement par des liens ioniques avec des acides aminés basiques (arg, his, et lys) et des interactions hydrophobes (acides aminés hydrophobes).

3.2. Le protocole de dosage

Le surnageant d'une culture bactérienne est récupéré après centrifugation de la culture à 10 000g durant 10 min. Ensuite 20 µl de ce surnageant sont additionnés à 980 µl de solution de Bradford puis sont incubés pendant 10 minutes à l'obscurité. La lecture de la DO est réalisée à 590 nm.

3.3. Préparation de la courbe d'étalonnage

La quantité de protéine est déterminée grâce à la courbe d'étalonnage de l'Albumine de Sérum Bovin (BSA), qui est préparée à partir de plusieurs solutions mères de BSA, comme l'indique le tableau 17. La courbe d'étalonnage est présentée dans l'Annexe 2.

Tableau 17. Préparation de la gamme étalon de BSA :

Quantité de BSA (µg)	0	5	10	15	20
Volume de BSA et la concentration de la solution stock	0	20 µl de 250 µg/ml	20 µl de 500 µg/ml	20 µl de 750 µg/ml	20 µl de 1000 µg/ml
Volume de Réactif de Bradford (µL)	1000	980	980	980	980
Incubation 10 minutes à température ambiante et dans l'obscurité et lecture de la DO à 590 nm					

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1. Révélation de l'activité qualitative

189 souches de la collection bactérienne composée de 227 isolats se sont révélées avoir au moins une activité hydrolytique sur milieu solide. De ces 189 isolats, 43% sont des producteurs de cellulase, 34% sont des amylases positives, 33% sont des inulinases positives, 29% sont des pectinase positives et 12% sont des producteurs de protéases. Aucune souche ne possède les 5 activités enzymatiques testées, 3 souches possèdent à la fois les 4 activités enzymatiques dont les 2 activités CMCase et inulinase. Cependant 18, 51 et 117 souches ont présenté respectivement trois, deux et une activité(s) hydrolytique(s).

Pour l'activité cellulase, l'isolat 99SS2 présente le halo d'activité le plus élevé, comme le montre la figure 20 :

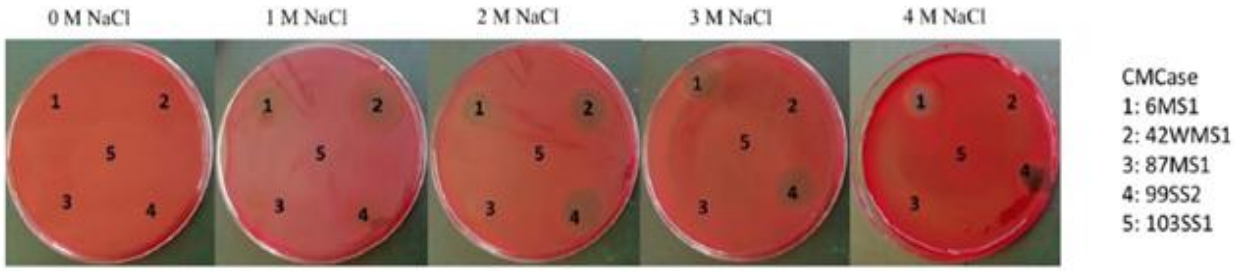


Figure 20. Révélation de l'activité cellulase par le rouge Congo sur boîte M9-CMC à différentes concentrations en NaCl (de 0.0 M à 4.0 M).

93.75% des souches à Gram négatif ont montré une activité hydrolytique, contre 77.55% pour celles à Gram positif. Contrairement à nos résultats, dans l'étude de Berrada et *al.*, 2012, 98.0% des bactéries à Gram positif ont montré une activité hydrolytique contre 68.0% des bactéries à Gram négatif. Babavalian et *al.*, en 2013, a trouvé beaucoup plus de producteur d'enzyme hydrolytique chez les bactéries à Gram positif que chez celles à Gram négatif.

Les différents substrats et les différentes techniques de révélation de l'activité enzymatique ont donné les mêmes résultats, mais une différence dans l'intensité et la clarté des halos est observée. En ce qui concerne l'activité cellulase et pectinase, la révélation au lugol permet une révélation plus claire et distincte à forte concentration en NaCl. Pour l'activité pectinase, la pectine de pomme diffuse mieux dans la gélose comparée au PGA, ce qui permet une révélation plus claire de l'activité. Ce constat est le même pour l'activité protéase où l'utilisation du lait écrémé donne des halos plus clairs que l'utilisation du lait en poudre diffusant moyennement dans la gélose. Pour l'activité inulinase tous les isolats dont la croissance prouve l'activité ont été confirmés par le lugol.

En ce qui concerne l'activité selon la concentration en NaCl, différentes réponses selon l'activité testée ont été remarquées, comme le montre le tableau 18, on remarque par exemple que le plus grand nombre de souches dotées d'activité se trouve entre 0.2 M et 4.0 M de NaCl.

A partir de 4.5 M de NaCl, aucune souche dotée d'activité protéase n'a été detecté et une seule souche halotolérante est dotée d'activité amylase. A 5.5M NaCl, il y a seulement deux souches halophiles extrêmes dotées d'activité cellulase (29SSS1) et d'activité inulinase (56WMS1).

Tableau 18. Répartition des souches selon leurs activités enzymatiques et selon la concentration en NaCl testée.

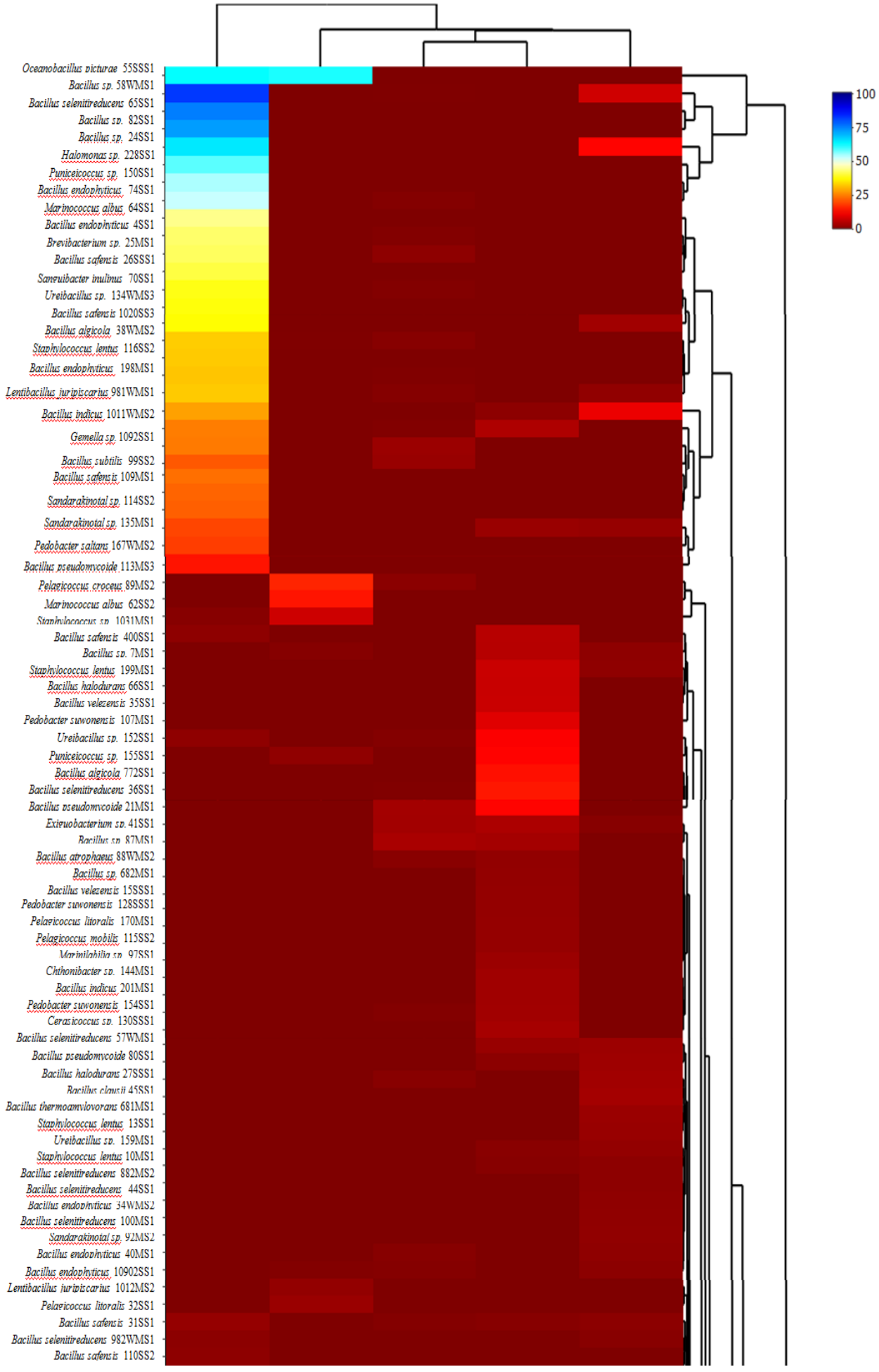
Concentration de NaCl (M)	0.0	0.2	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5
Activité enzymatique	Nombre de souches											
Amylase	9	29	46	37	31	17	15	9	3	1	0	0
Cellulase	6	36	45	39	33	13	12	9	5	5	1	1
Inulinase	11	29	28	27	22	13	13	13	13	12	2	1
Pectinase	11	28	29	25	19	11	9	7	6	4	1	0
Protéase	6	10	12	11	6	2	2	2	1	0	0	0

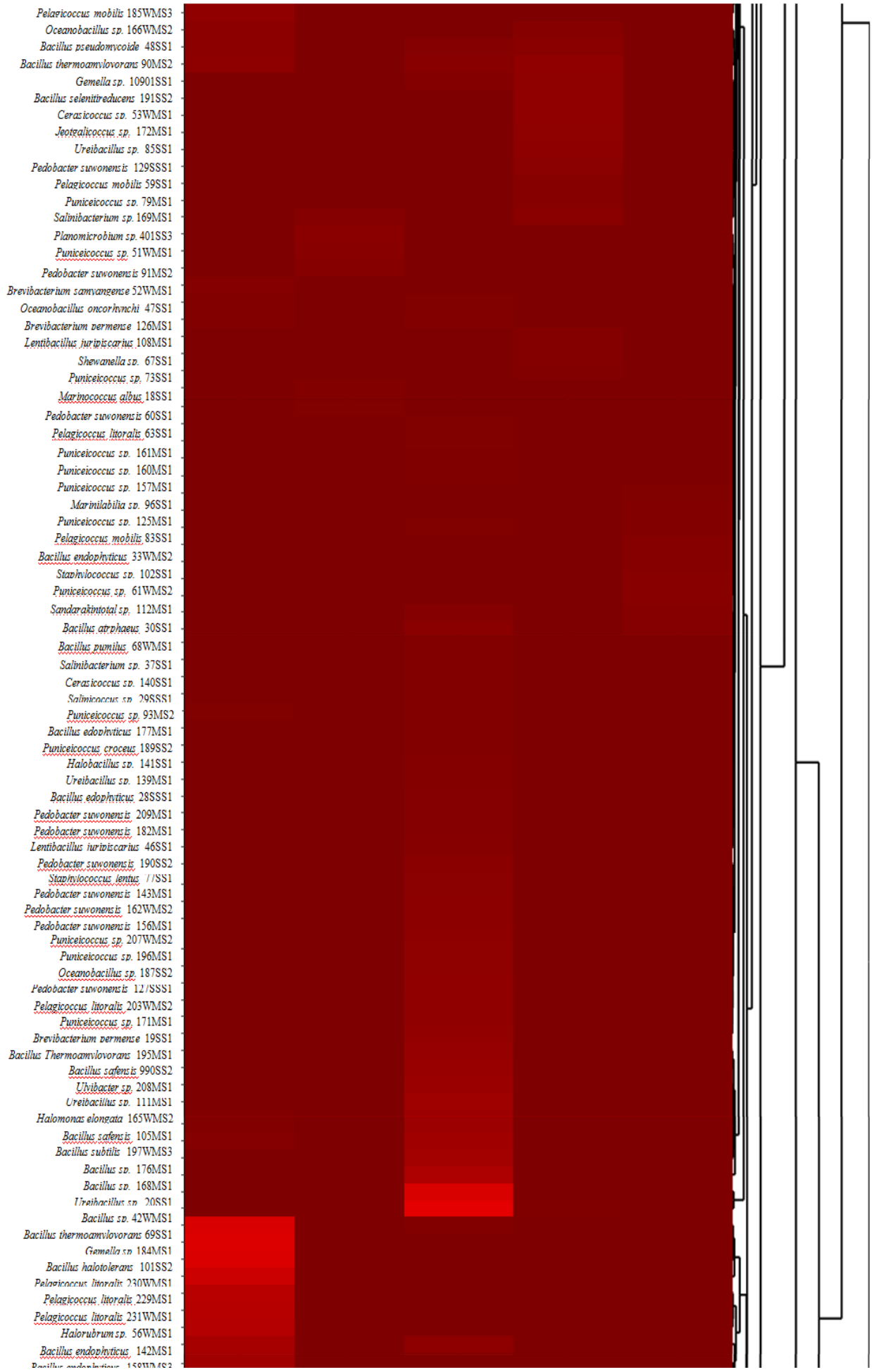
Les genres *Bacillus, Pedobacter, Pelagicoccus, Puniceicoccus, Salinibacterium, Lentibacillus* et *Brevibacterium* présentent plus d'une activité hydrolytique. Les activités cellulase, amylase, inulinase, pectinase et protéase ont été exprimées par de nombreuses souches appartenant à 19, 18, 16, 11, et 9 genres différents, respectivement. La prédominance de genre *Bacillus* a été remarquée dans de nombreuses études (Rodriguez-Valera, 1988 ; Khunt et *al.*, 2011).

Sur les 17 souches halophiles extrêmes, 9 souches présentent une seule activité enzymatique, 6 souches possédent à la fois deux activités enzymatiques et 1 seule souche possède à la fois 3 activités (cellulase, pectinase et inulinase).

En ce qui concerne les activités enzymatiques par rapport au site d'isolement, on remarque que dans le site 1, la majorité des isolats sont dotés d'activité cellulase (61 isolats) et amylase (51 isolats), et que la majorité des cellulase positives font partie du genre *Bacillus,* aucun isolat doté d'activité Cellulase n'a été detectée dans le genre *Pelagicoccus*. Le Genre *Pedobacter* se caractérise par l'absence de l'activité protéase et inulase (seulement une souche sur 16 possède une faible activité inulinase).

En résumé, nous pouvons conclure qu'il existe une grande diversité taxonomique de micro-organismes démontrant une activité hydrolytique dans des environnements hypersalins et dans la plupart des cas, de multiples activités sont présentes. La distribution aérienne des spores expliquerait probablement la présence de *Bacillus* dans la plupart des habitats. Ce genre est bien connu en tant que producteur d'enzymes extracellulaires et de nombreux procédés industriels utilisent des espèces de ce genre pour la production commerciale d'enzymes (Schallmey et *al.*, 2004).


Oceanobacillus picturae 55SSS1
Bacillus sp. 58WMS1
Bacillus selenitireducens 65SS1
Bacillus sp. 82SS1
Bacillus sp. 24SS1
Halomonas sp. 228SS1
Puniceicoccus sp. 150SS1
Bacillus endophyticus 74SS1
Marinococcus albus 64SS1
Bacillus endophyticus 4SS1
Brevibacterium sp. 25MS1
Bacillus safensis 26SSS1
Saneuibacter inulinus 70SS1
Ureibacillus sp. 134WMS3
Bacillus safensis 1020SS3
Bacillus algicola 38WMS2
Staphylococcus lentus 116SS2
Bacillus endophyticus 198MS1
Lentibacillus juripiscarius 981WMS1
Bacillus indicus 1011WMS2
Gemella sp. 1092SS1
Bacillus subtilis 99SS2
Bacillus safensis 109MS1
Sandarakinotal sp. 114SS2
Sandarakinotal sp. 135MS1
Pedobacter saltans 167WMS2
Bacillus pseudomycoide 113MS3
Pelagicoccus croceus 89MS2
Marinococcus albus 62SS2
Staphylococcus sp. 1031MS1
Bacillus safensis 400SS1
Bacillus sp. 7MS1
Staphylococcus lentus 199MS1
Bacillus halodurans 66SS1
Bacillus velezensis 35SS1
Pedobacter suwonensis 107MS1
Ureibacillus sp. 152SS1
Puniceicoccus sp. 155SS1
Bacillus algicola 772SS1
Bacillus selenitireducens 36SS1
Bacillus pseudomycoide 21MS1
Exiguobacterium sp. 41SS1
Bacillus sp. 87MS1
Bacillus atrophaeus 88WMS2
Bacillus sp. 682MS1
Bacillus velezensis 15SSS1
Pedobacter suwonensis 128SSS1
Pelagicoccus litoralis 170MS1
Pelagicoccus mobilis 115SS2
Marimicrobia sp. 97SS1
Chthonibacter sp. 144MS1
Bacillus indicus 201MS1
Pedobacter suwonensis 154SS1
Cerasicoccus sp. 130SSS1
Bacillus selenitireducens 57WMS1
Bacillus pseudomycoide 80SS1
Bacillus halodurans 27SSS1
Bacillus clausii 45SS1
Bacillus thermoamylovorans 681MS1
Staphylococcus lentus 13SS1
Ureibacillus sp. 159MS1
Staphylococcus lentus 10MS1
Bacillus selenitireducens 882MS2
Bacillus selenitireducens 44SS1
Bacillus endophyticus 34WMS2
Bacillus selenitireducens 100MS1
Sandarakinotal sp. 92MS2
Bacillus endophyticus 40MS1
Bacillus endophyticus 10902SS1
Lentibacillus juripiscarius 1012MS2
Pelagicoccus litoralis 32SS1
Bacillus safensis 31SS1
Bacillus selenitireducens 982WMS1
Bacillus safensis 110SS2
100
75
50
25
0


Pelagicoccus mobilis 185WMS3
Oceanobacillus sp. 166WMS2
Bacillus pseudomycoide 48SS1
Bacillus thermoamylovorans 90MS2
Gemella sp. 10901SS1
Bacillus selenitireducens 191SS2
Cerasicoccus sp. 53WMS1
Jeotgalicoccus sp. 172MS1
Ureibacillus sp. 85SS1
Pedobacter suwonensis 129SSS1
Pelagicoccus mobilis 59SS1
Puniceicoccus sp. 79MS1
Salinibacterium sp. 169MS1
Planomicrobium sp. 401SS3
Puniceicoccus sp. 51WMS1
Pedobacter suwonensis 91MS2
Brevibacterium samyangense 52WMS1
Oceanobacillus oncorhynchi 47SS1
Brevibacterium vermense 126MS1
Lentibacillus juripiscarius 108MS1
Shewanella sp. 67SS1
Puniceicoccus sp. 73SS1
Marinococcus albus 18SS1
Pedobacter suwonensis 60SS1
Pelagicoccus litoralis 63SS1
Puniceicoccus sp. 161MS1
Puniceicoccus sp. 160MS1
Puniceicoccus sp. 157MS1
Marinilabilia sp. 96SS1
Puniceicoccus sp. 125MS1
Pelagicoccus mobilis 83SS1
Bacillus endophyticus 33WMS2
Staphylococcus sp. 102SS1
Puniceicoccus sp. 61WMS2
Sandarakinotal sp. 112MS1
Bacillus atrophaeus 30SS1
Bacillus pumilus 68WMS1
Salinibacterium sp. 37SS1
Cerasicoccus sp. 140SS1
Salinicoccus sp. 29SSS1
Puniceicoccus sp. 93MS2
Bacillus edophyticus 177MS1
Puniceicoccus croceus 189SS2
Halobacillus sp. 141SS1
Ureibacillus sp. 139MS1
Bacillus edophyticus 28SSS1
Pedobacter suwonensis 209MS1
Pedobacter suwonensis 182MS1
Lentibacillus juripiscarius 46SS1
Pedobacter suwonensis 190SS2
Staphylococcus lentus 77SS1
Pedobacter suwonensis 143MS1
Pedobacter suwonensis 162WMS2
Pedobacter suwonensis 156MS1
Puniceicoccus sp. 207WMS2
Puniceicoccus sp. 196MS1
Oceanobacillus sp. 187SS2
Pedobacter suwonensis 127SSS1
Pelagicoccus litoralis 203WMS2
Puniceicoccus sp. 171MS1
Brevibacterium vermense 19SS1
Bacillus Thermoamylovorans 195MS1
Bacillus safensis 990SS2
Ulvibacter sp. 208MS1
Ureibacillus sp. 111MS1
Halomonas elongata 165WMS2
Bacillus safensis 105MS1
Bacillus subtilis 197WMS3
Bacillus sp. 176MS1
Bacillus sp. 168MS1
Ureibacillus sp. 20SS1
Bacillus sp. 42WMS1
Bacillus thermoamylovorans 69SS1
Gemella sp. 184MS1
Bacillus halotolerans 101SS2
Pelagicoccus litoralis 230WMS1
Pelagicoccus litoralis 229MS1
Pelagicoccus litoralis 231WMS1
Halorubrum sp. 56WMS1
Bacillus endophyticus 142MS1

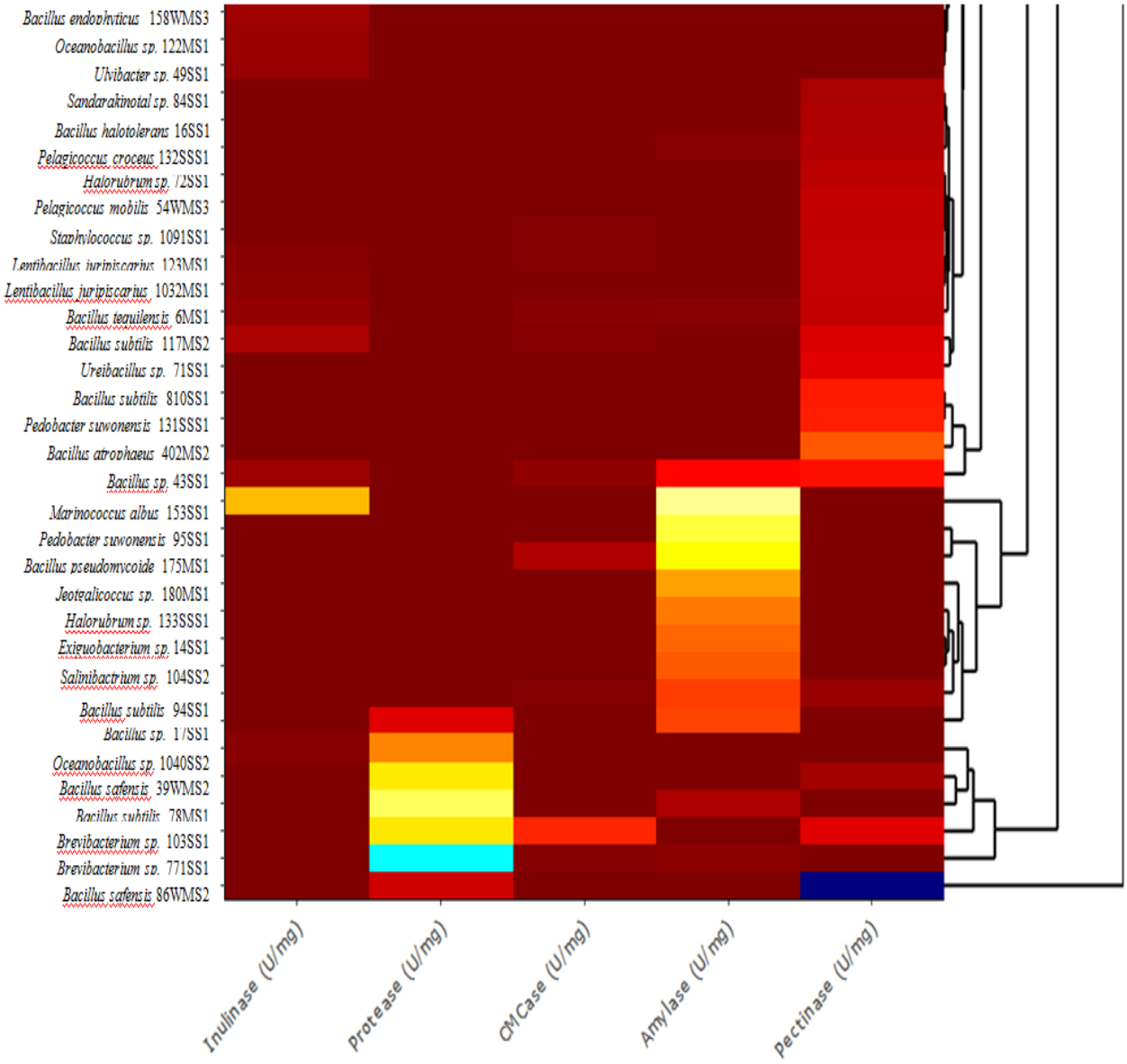


Figure 21. Regroupement des isolats en fonction de leurs activités enzymatiques. L'échelle des valeurs pour indiquer les activités enzymatiques calculées et exprimées de 0 à 100 U/mg.

2. Révélation de l'activité quantitative

Sur la base du test qualitatif, 189 isolats ont été étudiés pour la production d'enzymes hydrolytiques dans des cultures liquides par le dosage des activités enzymatiques. Toutes les souches ont pu produire des enzymes hydrolytiques dans leur plage de tolérance au NaCl. Dans le tableau A2.1 de l'annexe 2, figure les résultats des dosages de toutes les souches.

Les résultats du dosage quantitatif montre que sur les 189 souches, 117 souches possèdent une seule activité enzymatique, alors que 51, 18 et 3 souches possédent deux, trois et qautre activités enzymatiques, respectivement.

Sur les 189 souches, 43% possèdent l'actvité CMCase, suivis de 34% ayant l'activité amylase et 32% celle inulinase. L'actvité pectinase est exprimée par 28% et celle protéase par 12% des souches.

On a remarqué que certaines souches de même espèce ont des activités différentes et avec différentes intensités, par exemple les 3 souches *Bacillus atrophaeus* de la collection 30SS1, 402SS2 et 88WMS2 ont toutes été pectinases positives avec 0.97 U/mg, 21.04 U/mg et 0.39 U/mg, respectivement, la souche 88WMS2 s'est avéré dotée d'activité amylase et CMCase alors que les deux autres *Bacillus atrophaeus* ne possèdent pas ces activités. Ceci peut être expliqué par des mutations génétiques qui se produisent au cours de l'évolution adaptative (Hou et *al.*, 2016 ; Cheng et *al.*, 2018). Ces mutations peuvent entraîner directement ou indirectement soit la diminution soit l'inhibition de l'expression génétique du gène codant pour l'enzyme hydrolytique. Diverses capacités adaptatives peuvent donc être développées par certaines bactéries face à la disponibilité réduite des nutriments (Vera-Gargallo & Ventosa 2018).

Les essais quantitatifs ont montré que les catégories de bactéries légèrement halophiles et halotolérantes étaient fortement représentées parmi les bactéries hydrolytiques. Les activités enzymatiques principales pour les groupes légèrement halophiles et halotolérants concernent les activités cellulase et amylase. En revanche, la plupart des souches modérément halophiles présentent une production modérée d'enzymes cellulases et une production élevée d'inulinases, d'amylases, de pectinases et de protéases. Les souches extrêmement halophiles présentent une faible production de cellulases, de pectinases et de protéases mais elles dégradent fortement l'inulinase (Tableau 19).

Tableau 19. Gammes d'activités enzymatiques d'enzymes hydrolytiques produites par les 189 souches halophiles après 24h d'incubation à 37°C. Les activités enzymatiques sont exprimées en UI/mg de protéines extracellulaires totales.

	Cellulase (U/mg)	**Amylase (U/mg)**	**Pectinase (U/mg)**	**Inulinase (U/mg)**	**Protéase (U/mg)**
Faiblement halophile et halotolérant	0.02 ± 0.01 à 16.33 ± 4.77	0.04 ± 0.01 à 21.50 ± 4.11	0.18 ± 0.10 à 21.40 ± 3.02	0.13 ± 0.06 à 43.26 ± 4.41	0.03 ± 0.01 à 1.89 ± 0.25
Halophile Modérée	0.02 ± 0.01 à 3.16 ± 0.03	0.02 ± 0.01 à 14.93 ± 2.57	0.06 ± 0.02 à 12.95 ± 0.06	0.04 ± 0.01 à 75.98 ± 1.23	0.01 ± 0.00 à 1.93 ± 0.24
Halophile extrême	0.29 ± 0.02 à 0.54 ± 0.05	0.01 ± 0.00 à 1.24 ± 0.06	1.21 ± 0.18 à 9.13 ± 0.62	0.03 ± 0.02 à 53.29 ±7.78	1.64 ± 0.18

2.1. Activité cellulase

En termes d'activité cellulase, les 43% de la collection possédant l'activité cellulase (81 souches) peuvent être subdivisés en deux groupes, le 1er groupe avec une activité enzymatique assez élévée de 16.33, 10.02 et 8.9 U/mg pour les souches *Brevibacterium sp.* 103SS1 (halotolérante),

Bacillus sp. 42WMS1 (Faiblement Halophile) et *Ureibacillus sp.* 20SS1 (Faiblement Halophile), respectivement. Le 2ème regroupe 78 souches ayant une activité allant de 0.02 à 3.55 U/mg, parmi lesquelles 7 souches sont halophiles extrêmes, ayant une activité enzymatique (AE) allant de 0.29 à 0.54 U/mg. Il faut noter que le témoin contrôle pour l'activité CMCase utilisé dans cette étude est *Dickeya solani* qui est doté d'AE de 2.25 U/mg. 37 souches CMCase$^+$ appartiennent au genre *Bacillus* ce qui correspond à 47% des souches CMCase$^+$, il s'en suit le genre *Pedobacter* avec 7 souches puis les genres *Puniceicoccus*, *Brevibacterium* et *Lentibacillus* avec 6 et 5 souches, respectivement. Comme dans notre étude, Wei et *al.,* 2018 ont observé une proportion élevée de producteurs de cellulase chez des souches du genre *Bacillus.*

2.2. Activité amylase

L'analyse de l'activité amylase montre que 34% des souches possèdent cette activité et permet de les subiviser en 2 groupes, le 1er groupe présente 5 souches, *Salinibacterium sp.* 104SS2 avec une AE de 21.50 U/mg, *Exiguobacterium sp*. 41SS1 (14.93 U/mg), 3 souches de *Bacillus spp*. (43SS1, 772SS1 et 87MS1) avec une activité 12.98 pour les deux premières et 12.42 U/mg pour la dernière. Le 2ème groupe comprend 59 souches avec un éventail d'AE de 0.02 à 7.55 UE/mg dont 2 appartiennent à la catégorie d'halophiles extrêmes, il s'agit de *Bacillus selenitireducens* 57WMS1 (AE= 1.24 U/mg) et *Bacillus halodurans* 27SSS1 *(*AE = 1.05 U/mg). Contrairement à l'étude de Rohban et *al.,* en 2009 où *Oceanobacillus* a été le genre prédominant doté d'activité amylase, notre étude ne dénombre aucune souche dotée d'activité amylase et d'activité pectinase. Dans l'étude de Al-Rubaye et *al.,* (2017) l'activité amylase a été principalement observée chez les isolats des genres *Bacillus, Halobacillus* et *Oceanobacillus*.

Le genre *Bacillus* est aussi parmi les genres dominants pour la production élevée d'amylase dans l'étude menée par Wei *et al.,* (2018) et de l'étude de Menasria et *al.,* (2019). Notre étude a montré que 50% des souches (33 souches) possédant l'activité amylase appartiennent au genre *Bacillus* suivi du genre *Pedobacter* et *Pelagicoccus* (5 souches).

2.3. Activité pectinase

Pour l'activité pectinase, les 54 souches dotées de cette activité représentent 28% de la collection de 189 souches à activité hydrolytique et peuvent être subdivisées en deux groupes, le 1er représenté par 7 souches dont *Brevibacterium sp*. 103SS1 et 6 souches de *Bacillus spp*. (24SS1, 402SS2, 43SS1, 86WMS2, 101WMS2 et 117MS2) avec une activité de 21.40 à 9.13 U/mg. La souche *Bacillus atrophaeus* 402SS2 a montré l'activité la plus élevée d'une valeur de 21.50 U/mg. Le 2ème comprend 46 souches avec un éventail d'AE de 0.06 à 7.93 U/mg dont 3 souches appartiennent à la catégorie d'halophiles extrêmes.

Al-Rubaye *et al.* en 2017 et Wei et *al.*en 2018 ont aussi observé dans leurs études menés sur des écosystèmes hypersalins que le genre *Bacillus* est un puissant producteur de pectinase.

2.4. Activité inulinase

C'est une activité qu'on a trouvée chez 63 souches ce qui représente 33% des 189 souches ayant au moins une activité hydrolytique. Les valeurs des activités varient de 0.1 à 75.98 U/mg. On peut regrouper ces souches dans 3 groupes en termess d'activité inulinase :

- 1er groupe composé des souches à activité élevée allant de 35 à 76 UE/mg, et qui est composé uniquement de souches du genre *Bacillus* (8 souches), notamment *Bacillus selenitireducens* 65SS1 qui présente l'activité la plus élevée de 76 U/mg. Dans ce groupe on trouve la *souche Bacillus endophyticus* 74SS1 qui est une bactérie halophile extrême avec une AE 53.29 U/mg
- 2ème groupe contient des souches à activité moyenne allant de 14 à 33 U/mg. Deux halophiles extrêmes *Oceanobacillus picturae* 55SSS1 *et Sanguibacter inulinus* 70SS1 sont dotées d'une activité inulinase de 31.13 et 25.74 UE/mg, respectivement. Il est important de noter que c'est la première fois que le genre *Sanguibacter* est décrit comme halophile extrême.
- 3ème groupe regroupant les souches dotées d'une activité faible inférieure à 10 U/mg.

Ces résultats montrent que les halophiles sont dotés d'une activité inulinase élevée et ouvre une voie prometteuse pour la caractérisation et l'optimisation d'une inulinase halophile performante. L'activité inulinase est rarement testée dans les précédentes études. Rohban et *al.*, 2009, ont recensé du lac Howz Soltan en Iran 95/231 isolats dotés d'activité inulinase à 2.0 et 3.0 M NaCl. Alors que dans les études de Ruginescu et *al. (*2019) sur des halophiles isolés du désert d'Atacama au Chili et dans l'étude Wei et *al.,* 2018, aucun isolat halophile n'a été doté d'activité inulinase.

2.5. Activité protéase

12% des souches de la collection ont une activité protéase dont la plus élevée est d'une valeur de 1.93 UE/mg pour *Pelagicoccus litoralis* 32SS1. Une seule souche halophile extrême *Oceanobacillus picturae* 55SSS1 présente une activité protéase dont la valeur est de 1.64 UE/mg.

Kumar et *al. (*2012) ont isolé, de différents habitats salins en Inde, 108 isolats halophiles, dont 33 sont dotés d'activité protéase, avec les isolats du genre *Bacillus*, *Virgibacillus* et *Marinobacte*r comme les plus puissants producteurs. Wei et *al. (*2018) ont également isolé à partir d'écosystèmes salins en Algérie des *Bacillus sp.* dotés d'activité protéase.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce chapitre est une contribution à la caractérisation des souches isolées des biotopes extrêmes en termes d'activités hydrolytiques. Les enzymes extrêmophiles, surtout des halophiles, sont peu étudiés et particulièrement au Maroc. La recherche des activités cellulase, amylase, inulinase, pectinase et protéase a été réalisés sur une collection de 227 isolats récoltés de 3 biotopes hypersalins de la région de Fès et de Taza, en utilisant un milieu de culture contenant différentes concentrations de NaCl. Sur ces 227 isolats, 189 ont manifesté au moins une des activités hydrolytiques rechechées. Ces 189 souches ont été identifiés et appartiennent à 26 genres différents (Tableau 11).

L'activité cellulase est la plus représentée dans cette sous collection de 189 bactéries halophiles avec 43% des souches dotées d'activité cellulase, suivie de l'activité amylase et inulinase avec 34% et 32% respectivement. Concernat l'activité pectinase et protéase, 28% et 12% des souches sont dotées de ces activités, respectivement.

Ces résultats montrent qu'il y a un grand nombre de producteurs d'enzymes hydrolytiques dans les environnements hypersalins et que ces activités hydrolytiques et leurs efficacités sont en corrélation avec les concentrations de NaCl. De plus, de fortes activités enzymatiques ont été enregistrées après seulement 24 heures d'incubation et dans un milieu minimum.

Les souches du site 1, la mine de sel naturel de jbel zalagh à Fès, sont les plus performantes en termes de production d'enzymes hydrolytiques. Une majorité de ces souches appartiennent au genre *Bacillus,* mais aussi d'autres genres : *Brevibacterium, Salinibacterium, Exiguobacterium* et *Pelagicoccus*

La majorité des études sur les protéines ou la production d'enzyme d'organismes halophiles se concentre sur les catégories faiblement et modérément halophiles, grâce à notre travail, certaines souches halophiles extrêmes ont montré de forte activité inulinase et relativement forte activité pectinase qui ouvre la voie à d'autre volet de recherche.

Une cinétique de production d'enzymes hydrolytiques de ces 189 souches à différentes concentration en NaCl, serait aussi un moyen de séléctionner le plus performante à forte concentration en NaCl

Cette étude de production d'enzyme par dosage péliminaire des activités enzymatiques de bactéries halophiles issues de tels environnements hypersalins, naturels et artificiels, a aussi permis la mise en évidence du potentiel de ces environnements extrêmes qui de prime abord sont hostiles, ne sont pas riches en substrat. Cela montre la capacité des souches à s'adapter à leurs biotopes et à la disponibilité réduite des nutriments.

Chapitre 4

Production et Caractérisation de Cellulases

INTRODUCTION

Les enzymes cellulolytiques ou cellulases font l'objet de nombreuses études, pour cause leur diverses applications industrielles, telles que l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique, les industries textile, du papier et de l'énergie. Toute l'importance des cellulases résident dans leurs potentiels à dégrader la cellulose qui est l'un des déchets végétaux les plus répandus: 1 500 milliards de tonnes de cellulose produites chaque année (Moniri et *al.*, 2017). La recherche d'enzymes de plus en plus performants a mené les chercheurs à se tourner vers de nouvelles sources ou producteurs d'enzymes. Les micro-organismes extrêmophiles ont montré une grande stabilité et activité sous plusieurs paramètres extrêmes telle que de hautes températures, de fortes concentrations en sel, des agents chimiques, des pH extrêmement acides ou basiques et des composés organiques.

La plupart des études récentes sur les micro-organismes producteurs de cellulases ont montré la prédominance des bactéries, de leur croissance très rapide et de leur capacité à s'adapter à divers environnements extrêmes (Azadian et *al.*, 2017, Zhu et al., 2020). Parmi les bactéries, les souches de *Bacillus* sont d'excellents producteurs de cellulase, comme *B. sphaericus* et *B. subtilis* (Sreena & Sebastian 2018). Mais aussi les *Actinomycetes* et *Thermobifida* et d'autres genres comme *Pseudomonas* et *Sphingomonas* (Sandhya & Renuka 2019).

Du chapitre précedent sur le criblage d'activité enzymatique, certaines souches de la collection bactérienne halophile ont montrés de forte production de cellulase, que ce soit lors de la révélation de l'activité cellulase lors du test sur milieu gélosé ou lors du dosage qualitatif. Suite à ces résultats, les objectifs de ce chapitre sont :

- étudier l'aptitude des souches bactérienne halophiles les plus performantes de la collection à la production de cellulases.
- étudier l'aptitude de certaines souches à la dégradation de cellulose
- optimiser la production et la caractérisation biochimique d'une cellulase, active à concentration de NaCl élevée, produite par la souche *Bacillus subtilis* 99SS2.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souches choisies pour la suite de l'étude sur les cellulases ont été sélectionnées sur la base des résultats du test qualitatif et quantitatif décrit dans le chapitre précédent.

1. Cinétique de croissance et de production de cellulase à différentes concentrations en NaCl

1.1. Cinétique de croissance des souches les plus performantes en termes de production de cellulase

La cinétique de croissance, l'activité cellulase et la production des protéines des 10 souches sélectionnées ayant montré une importante activité sur milieu solide ont été réalisées dans le milieu minimum M9 avec 0.5% de CMC-Na et différentes concentrations en NaCl, pendant 50 heures de croissance à 37°C et à 140 rpm.

Pour la souche *Bacillus subtilis* 99SS2, après optimisation des conditions, la cinétique de croissance, l'activité cellulase et la production des protéines ont été réalisées avec différents substrats (CMC, Cellulose et Cellobiose), pendant 30h à 30°C et à 140 rpm. Nous avons utilisé le milieu minimum supplémenté de 1 g/l d'extrait de levure, 1.0 M de NaCl et 1 g/l de chaque substrat. L'effet de la source de carbone sur la croissance et sur la production de la cellulase a été réalisé en utilisant comme sources de carbone : le lactose, le maltose, le glucose, le saccharose, la cellulose, le cellobiose, le filtre en papier (Whatman N°2) ou le sodium de carboxyméthylcellulose. Le filtre papier Whatman N°2 est préalablement découpé en petits morceaux rectangulaire puis pesé.

1.2. Optimisation des conditions de croissance et de production de la cellulase de *B. subtilis* 99SS2

Le modèle Plackett-Burman (PB) a été utilisé pour le criblage des principales variables qui influence la production de la cellulase. L'effet de huit variables composées de sept facteurs chimiques a été évalué : carboxyméthylcellulose (CMC), extrait de levure, $MgSO_4,7H_2O$, $CuSO_4,5H_2O$, $CoSO_4,7H_2O$, NaCl, peptone et un facteur physique, la température. Les réponses sont la DO 540 nm et la croissance (DO 600 nm). À partir de l'analyse des variables avec ANOVA (qui sont significatives à un niveau supérieur ou égal à 95% ($p < 0,05$)), les facteurs montrant un impact plus important sur l'activité de la cellulase ont été optimisés. L'analyse de l'effet de l'interaction des trois principaux facteurs sur la production et la croissance de la cellulase a également été réalisée. Les quatre principaux facteurs seront sélectionnés pour l'optimisation des processus à l'aide de Box-Buhnken. Pour chaque expérience, les différents milieux de culture ont été centrifugés à 4°C et 8 000 g pendant 10 min, après 24 heures de croissance. L'activité cellulase ainsi que la quantité de sucre réducteur présent dans le surnageant suite à la métabolisation du substrat durant la croissance a été estimée, comme décrit dans matériel et méthodes du chapitre 3.

2. Propriétés enzymatiques et caractérisation des extraits protéiques bruts

2.1. Obtention de l'extrait protéiquebrut

Le surnageant de la culture a été obtenu après centrifugation (8 000g pendant 10 minutes) et filtration (filtres de 45 µm). La précipitation des protéines a été effectué par l'ajout au surnageant de sulfate d'ammonium pour atteindre 80% de saturation. Le précipité a été récupéré par centrifugation à 10 000 g pendant 20 minutes, puis dissous dans un tampon phosphate de sodium à 0.1 M (pH 7.0) ou un tampon acétate de sodium à 0.1 M (pH 4.8), puis dialysé contre le même tampon pendant 48h. La fraction dialysée a été utilisée comme extrait protéiquebrut pour les différentes expériences réalisées. Sauf indication contraire, toutes les étapes de précipitation ont été effectuées à 4°C.

Pour la souche *Bacillus subtilis* 99SS2 et pour déterminer la technique permettant un bon rendement d'extraction de protéines, le même protocole présenté dans la figure 22 a été utilisé, à la seule différence que la précipitation a été effectué soit par : le sulfate d'ammomium à 80% de saturation, ou le sulfate d'ammonium à 100% de saturation, ou l'acétone à 80% de saturation ou le PEG 6000 à 30% de saturation

2.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide natif (PAGE)

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide natif (PAGE) a été réalisée sur gel de polyacrylamide (Laemmli, 1970) et la révélation a été faite avec du bleu de Coomasie. Dans le tableau suivant, les volumes de chaque composé ou solution utilisée pour la préparation du gel sont énuméré. Le gel est préparé à 10% d'acrylamide ce qui nous permet de séparer les protéines en fonction de leurs poids moléculaires avec une gamme de séparation de 22 à 300 kDa. Le TEMED est l'acronyme du NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine. Le persulfate d'ammonium (AP) est à préparer extemporanément. L'AP et le TEMED sont ajoutés juste avant de couler chacun des gels.

Tableau 20. Composition d'un gel de polyacrylamide natif (PAGE) à 10%.

Gel de Concentration		**Gel de Séparation**	
H_2O distillé	3025 µl	**H_2O distillé**	3890 µl
Tris-HCl, pH 6.8 ; 0.5 M	1250 µl	**Tris-HCl, pH 8.8** ; 1.5 M	2600 µl
Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0.8% p/v)	670 µl	**Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0.8% p/v)**	3400 µl
Ammonium persulfate (AP) 10% (p/v)	50 µl	**Ammonium persulfate (AP)** 10% (p/v)	100 µl
TEMED	5 µl	**TEMED**	10 µl

Le gel de séparation est préparé en premier, dans un petit bêcher, comme le montre le tableau 21. Le gel est ensuite coulé délicatement ; en évitant la création de bulles d'air ; entre les plaques de verre préalablement fixées et assemblées sur le support. Recouvrir d'eau distillé ou d'isopropanol. Après une polymérisation de 20 à 30 minutes, éliminer l'eau distillé (ou l'isopropanol). Le gel de concentration prélablement préparé est coulé et un peigne est enchâsssé entre les plaques en prenant soin de ne pas laisser de bulles d'air.

2.3. Spécificité du substrat des extraits protéiques bruts

Dans un premier temps, les extraits protéiques bruts (EPB) préparés ont été testés pour leurs spécificités envers le CMC-Na et la cellulose à une concentration de 1% (p/v), pH 7.0 et différentes températures : 37, 55 et 65°C. La concentration finale des extraits protéiques bruts dans les différents tests a été fixée à 50 µg/ml.

Pour la souche *Bacillus subtilis* 99SS2, l'activité de l'EPB a été testée à différentes concentration de l'EPB allant de 10 µg/ml à 50 µg/ml, suite à quoi la concentration finale de l'EPB est fixée à 40 µg/ml pour le reste des tests.

La spécificité des substrats de l'EPB de la souche 99SS2 a été déterminée en effectuant le test avec différents substrats : CMC, cellobiose, cellulose et papier filtre Whatman N°2. Les valeurs représentent les pourcentages de l'activité enzymatique par rapport au contrôle qui est l'activité sur CMC. La stabilité de l'EPB a été determinée par mesure de l'activité enzymatique à 1/2h, 1h, 1h30min, 2h, 3h, 4h et 5h d'incubation à différentes températures testées.

2.4. Caractérisation de l'extrait protéiquebrut (EPB) : effet de la température, pH, salinité, solvants, détergents et ions métalliques sur l'activité Cellulase

L'effet et la stabilité de l'EPB de la souche *Bacillus subtilis* 99SS2 vis-à-vis de potentiels activateurs et / ou des inhibiteurs a été étudié, c'est pourquoi différentes gammes de température de 10 à 80°C, de pH de 4.0 à 10.0, de NaCl de 0 à 300 g/l ont été testées. Pour les autres facteurs, 1.0 mM d'ions métalliques, 150 ml/L (15% (v/v)) de solvant et 10 g/l d'EDTA, de Triton X-100, de B-mercaptoéthanol et de SDS ont été utilisés. Le tampon phosphate de sodium est utilisé pour les pH 4.0 à 7.0 et le tampon NaOH glycine pour les pH 8.0 à 10.0. Les ions métalliques suivants ont été utilisés : Ca^{2+}, Sn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, K^{+}, Mg^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}, Hg^{2+}, Cr^{2+} et Zn^{2+}. L'échantillon de contrôle est l'extrait protéiquesans solvant, ni additif, ni ion métallique et avec le CMC à 10 g/l, pH 7.0 et à 60°C. Tous les tests ont été réalisés en pré-incubant, dans l'état testé, pendant 1 heure à la température ambiante.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Cinétique de croissance et de production de cellulase à différentes concentrations en NaCl

Les dix souches ayant présenté un important halo d'activité CMCase sur milieu solide et une forte activité lors du dosage de l'activité cellulase en milieu liquide, ont été choisies pour réaliser la cinétique de la croissance, de la production de cellulase et de la synthèse des protéines, il s'agit de 3 souches halotolérantes, 4 faiblement halophiles et 3 halophiles modérées. Le tableau 21 représente l'activité cellulase optimale en U/mg de protéines obtenue à 37°C, 140 rpm dans le milieu M9 additionné de 0.5 % (p/v) CMC et à la concentration en NaCl selon la gamme appropriée à la catégorie d'halophilisme de la souche.

Tableau 21. Activité Cellulase en U/mg des souches les plus performantes à différentes concentration en NaCl. (-) : pas de croissance.

Nom de la souche (code)	Catégorie d'halophilisme	Cellulase (U/mg)				
		0.2 M NaCl (1%)	1.0 M NaCl (6%)	2.0 M NaCl (12%)	3.0 M NaCl (18%)	4.0 M NaCl (24%)
Brevibacterium sp. (103SS1)	Halotolérante	17.505 ± 2.60	2.064 ± 2.00	0.024 ± 0.01	-	-
Bacillus sp. (42WMS1)	Faiblement	6.910 ± 0.07	3.896 ± 0.07	-	-	-
Ureibacillus sp. (20SS1)	Faiblement	6.483 ± 0.38	1.177 ± 0.08	0.092 ± 0.01	-	-
Bacillus sp. (87MS1)	Faiblement	2.532 ± 0.16	1.809 ± 0.02	-	-	-
Bacillus atrophaeus (88WMS2)	Halotolérante	3.649 ± 0.24	3.141 ± 0.24	-	-	-
*Bacillus subtilis (*197WMS3)	Faiblement	4.047 ± 0.02	4.713 ± 0.01	-	-	-
Halomonas elongata 165WMS2	Modérée		2.909 ± 0.01	1.783 ± 0.04	0.963 ± 0.01	1.063 ± 0.01
Bacillus subtilis 99SS2	Modérée		3.299 ± 0.14	1.080 ± 0.01	0.533 ± 0.01	-
Bacillus safensis 109MS1	Modérée		2.196 ± 0.01	0.478 ± 0.09	0.386 ± 0.01	-
Bacillus tequilensis 6MS1	Halotolérante	2.599 ± 0.02	1.439 ± 0.02	1.083 ± 0.05	0.832 ± 0.04	0.241 ± 0.01

L'optimum d'activité obtenue diffère d'une souche à une autre et d'une concentration en NaCl à une autre. Les cinétiques sont présentées dans l'Annexe 3 (figure A3.1. à A3.10).

Pour les 3 souches : *Halomonas elongata* 165WMS2, *Bacillus subtilis* 99SS2 et *Bacillus safensis* 109MS1 qualifiées d'halophiles modérées, l'activité est détectée à la concentration de 1.0 M de NaCl (6% (p/v)) qui est de 2.909, 3.229 et 2.196 U/mg, respectivement. L'activité enzymatique enregistrée à la concentration 0.2 M pour les 7 souches halotolérantes et faiblement halophiles ou à 1.0 M de NaCl pour les 3 souches halophiles modérées, diminue avec l'augmentation de concentration en NaCl pour les 10 souches testées sauf pour la souche *Bacillus subtilis* 197WMS3 pour laquelle l'activité a augmenté de 4.07 à 4.7 U/mg à la concentration de 1.0 M de NaCl. A la concentration de 0.2 M de NaCl, la souche *Brevibacterium sp.* 103SS1 présente l'activité la plus élevée qui est de 13,8 U/mg suivi de *Bacillus sp.* 42WMS1 *et Ureibacillus sp.* 20SS1 avec une activité de 6.9 et 6.5 U/mg, respectivement. Cette activité est élevée par rapport à celle de la souche cellulytique contrôle : *Dickeya solani* IP2222 et qui est de 2.25 U/mg.

2. Propriété enzymatique et caractérisation des extraits protéiques des 10 souches sélectionnées

2.1. Obtention de l'extrait protéiquebrut

L'extrait protéiqueest préparé après 24h d'incubation et à la concentration en NaCl à laquelle l'activité enzymatique est optimale, c'est-à-dire : 0.2 M de NaCl pour les souches *Bacillus sp*. 42WMS1, *Ureibacillus sp.* 20SS1, *Bacillus sp*. 87MS1, *Bacillus atrophaeus* 88WMS2 et *Bacillus tequilensis* 6MS1 et à la concentration de 1.0 M de NaCl pour les isolats *Brevibacterium sp.* 103SS1, *Bacillus subtilis* 197WMS3, *Halomonas elongata* 165WMS2, *Bacillus safensis* 109MS1 et *Bacillus subtilis* 99SS2. La quantité de protéines obtenues après dialyse est mentionnée dans le tableau 21.

Tableau 22. Quantité de protéines des extraits protéiques bruts des souches choisies pour l'étude.

Nom de la souche	Tampon acétate de sodium 0.1 M pH 4.8		Tampon phosphate de sodium 0.1 M pH 7.0	
	DO 590 nm	Quantité de protéines en µg/ml	DO 590 nm	Quantité de protéines en µg/ml
Brevibacterium sp. 103SS1	0,0326 ± 0.002	76,14 ± 6.02	0,0550 ± 0.002	131,57 ± 4.78
Bacillus sp. 42WMS1	0,0123 ± 0.003	29.50 ± 7.30	0,0056 ± 0.001	13,55 ± 3.65
Ureibacillus sp. 20SS1	0,0126 ± 0.002	30,30 ± 5.52	0,0223 ± 0.002	53,42 ± 4. 98
Bacillus sp. 87MS1	0,0226 ± 0.001	54,22 ± 2.76	0,0380 ± 0.001	90,90 ± 2.39
Bacillus atrophaeus 88WMS2	0,0196 ± 0.001	47,04 ± 3.65	0,0233 ± 0.001	55,82 ± 3.65
Bacillus subtilis 197WMS3	0,009 ± 0.002	21,53 ± 4.78	0,0153 ± 0.003	36,68 ± 7.30
Halomonas elongata 165WMS2	0,0300 ± 0.001	71,77 ± 2.39	0,0370 ± 0.002	88,51 ± 4.78
Bacillus subtilis 99SS2	0,0633 ± 0.002	151,51 ± 4.98	0,1033 ± 0.001	247,20 ± 3.65
Bacillus safensis 109MS1	0,0420 ± 0.001	100,47 ± 2.39	0,0515 ± 0.002	123,20 ± 6.66
Bacillus tequilensis 6MS1	0,0293 ± 0.001	70,17 ± 3.65	0,0653 ± 0.001	156,29 ± 2.79

Le tampon phosphate de sodium à pH 7.0 s'est avéré plus efficace pour l'obtention des extraits protéiques bruts que le tampon acétate de sodium à pH 4.8. Pour le test de caractérisation des EPB, le choix s'est porté sur les souches ayant produit une quantité de protéine assez élevée : *Bacillus subtilis* 99SS2, *Bacillus tequilensis* 6MS1, *Brevibacterium sp.* 103SS1 et *Bacillus safensis* 109MS1.

2.2. Caractérisation des extraits protéiques bruts

Les extraits protéiques bruts ont été testés pour leurs spécificités envers le CMC-Na et la cellulose à une concentration de 1.0 % (p/v), à pH 7.0 et à différentes températures : 37, 55 et 65°C, avec une concentration finale de 50 µg/ml et après 1 et 3 heures d'incubation dans les conditions mentionnées. Le tableau 23 représente les résultats de ce test préliminaire. Nous remarquons que l'extrait le plus performant dans les conditions testées est celui de la souche *Bacillus subtilis* 99SS2 qui a montré une forte activité avec le CMC-Na et la cellulose.

Nous constatons également que cette activité, sur les substrats cellulose et CMC reste élevée aux 2 températures testées, 55°C et 65°C ce qui est en faveur du caractère thermophile de la cellulase de la souche *Bacillus subtilis* 99SS2.

Cette activité reste relativement stable après 3 heures d'incubation pour les températures testées 37°C, 55°C et 65°C. Ce test préliminaire nous a permis de choisir la souche : *Bacillus subtilis* 99SS2 pour l'étude suivante dont l'objectif est l'optimisation des conditions de croissance et de production de la cellulase qui s'est avérée d'après ce test la plus performante.

Tableau 23. Activité enzymatique de 0  1.0 U/ml des extraits protéiques bruts des souches testés à 50µg/ml : 103SS1, 6MS1, 99SS2 et 109MS1

Substrat	T°C	Nom des souches	Activité enzymatique (U/ml) après 1h	Activité enzymatique (U/ml) après 3h
CMC	37°C	Blanc		
		Bacillus tequilensis 6MS1		
		Bacillus safensis 109MS1		
		Bacillus subtilis 99SS2		
		Brevibacterium sp. 103SS1		
	55°C	Blanc		
		Bacillus tequilensis 6MS1		
		Bacillus safensis 109MS1		
		Bacillus subtilis 99SS2		
		Brevibacterium sp. 103SS1		
	65°C	Blanc		
		Bacillus tequilensis 6MS1		
		Bacillus safensis 109MS1		
		Bacillus subtilis 99SS2		
		Brevibacterium sp. 103SS1		
Cellulose	37°C	Blanc		
		Bacillus tequilensis 6MS1		
		Bacillus safensis 109MS1		
		Bacillus subtilis 99SS2		
		Brevibacterium sp. 103SS1		
	55°C	Blanc		
		Bacillus tequilensis 6MS1		
		Bacillus safensis 109MS1		
		Bacillus subtilis 99SS2		
		Brevibacterium sp. 103SS1		
	65°C	Blanc		
		Bacillus tequilensis 6MS1		
		Bacillus safensis 109MS1		
		Bacillus subtilis 99SS2		
		Brevibacterium sp. 103SS1		

3. Cellulase de la souche B. subtilis 99SS2 halophile modérée : optimisation de la production et caractérisation de l'extrait protéiquebrut

La souche a été isolée d'un marais salant à Meknasa, à Taza au Maroc (34 ° 15'50.21 "N 4° 3'26.46" W). Le potentiel de CMCase de la souche a d'abord été déterminé sur milieu minimum gélosé où une activité assez élevée a été décelée jusqu'à 3.0 M de NaCl, et ensuite confirmé par la mesure quantitative de l'activité.

Les propriétés culturales, morphologiques, physiologiques et biochimiques de la souche *B. subtilis* 99SS2 sont représentées dans le tableau 24 ci-dessous. L-arabinose, cellobiose, cellulose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-mannose, D-raffinose, lactose monohydrate, D-maltose, sacharrose, ribose, D-sorbitol et D-xylose sont utilisées comme source de carbone.

Tableau 24. Propriétés culturales, morphologiques, physiologiques et biochimiques de la souche 99SS2.

Caractérisation Phénotypique	La souche de 99SS2
Spore	+
Coloration de Gram	+
Forme	Bacille
Pigmentation	Blanche
Type réspiratoire	Aérobie anaérobie facultative
Mobilité	+
Marge de Température (°C)	20-40
Marge de ph	4.0-11.0
Oxydase	+
Catalase	+
H2S production	-
Uréase	-
Cellulase	+
Amylase	-
Pectinase	-
Protéase	-
Inulinase	+
DNase	+
Gélatinase	+
Esculinase	+
Nitrate Réductase	+
Citrate Réductase	+

L'analyse phylogénétique de la séquence de l'ADNr 16S (1454 bp) montre un maximum d'homologie avec le genre *Bacillus*. La séquence a aussi montré 100% d'identité avec la séquence de *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* (NR_112686.1) et 99% d'identité avec les séquences de *B. vallismortis* (NR_113994.1), *Bacillus halotolerans* (NR_115063.1), *Bacillus tequilensis* (NR_104919.1), *Bacillus mojavensis* (NR_112725.1), *Bacillus nakamurai* (NR_151897.1) et *Bacillus amyloliquefaciens* (NR_112685.1).

L'analyse des caractériques phénotypiques combinée à l'approche moléculaire a permis à la souche d'être désignée comme une *B. subtilis* 99SS2. La séquence de l'ADNr 16S de la souche 99SS2 est enregistrée sous le numéro d'accession GenBank : MK713722.

3.1. Criblage et optimisation des conditions de croissance et de production de la cellulase de B. subtilis 99SS2

Dans un premier temps, l'effet de la source de carbone sur la croissance et la production de la cellulase a été réalisé en utilisant comme sources de carbone : le lactose, le maltose, le glucose, le saccharose, la cellulose, le cellobiose, le filtre en papier (Whatman N°2) ou le Sodium de carboxyméthylcellulose à 1 g/l et à 1.0 M de NaCl (Figure 22)

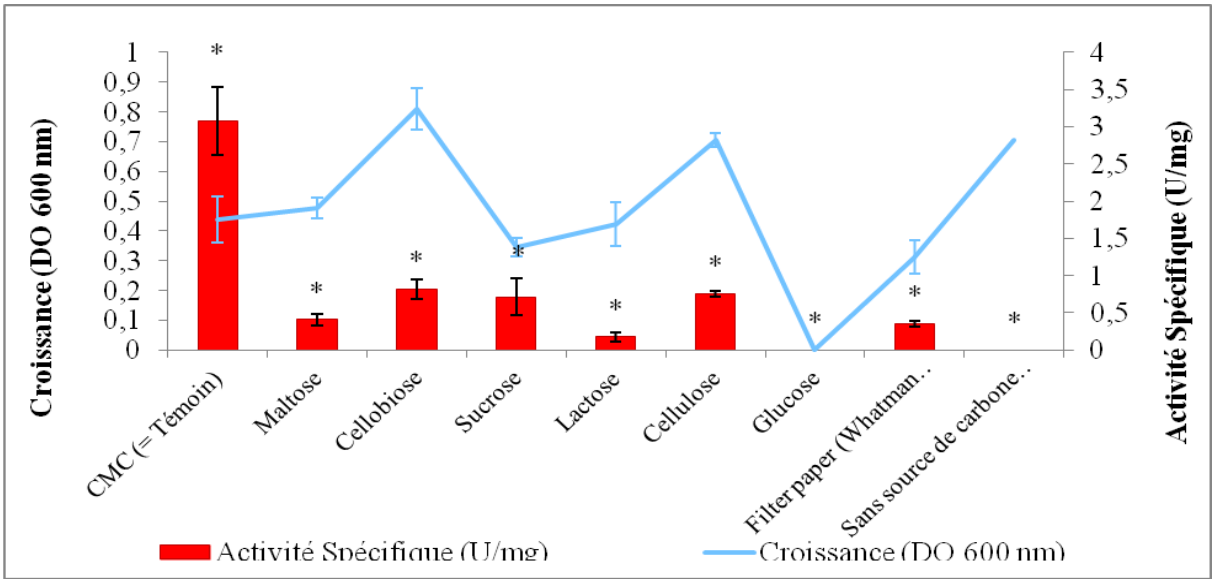


Figure 22. Effet des différentes sources de carbone sur la croissance (DO 600 nm) et l'activité enzymatique CMCase de la souche *Bacillus subtilis* 99SS2 après 24h d'incubation à 30°C. (*) Significatif : $p < 0.05$

Toutes les sources de carbone ont permis la croissance de la souche 99SS2,il y a même croissance de la souche en absence de source de carbone et aucune croissance en présence du glucose. Ceci peut être expliqué par l'absence ou la mutation des gènes responsables du transport ou de l'assimilation du glucose. L'inhibition de l'enzyme cellulase par la présence du glucose a déjà été observé (Teugjas et Valjamae 2013). Le présence du glucose ; source de carbone abondantes et facilement assimilable ; dans le milieu, empêcherait la production de cellulase (Zhai et *al.*, 2018).

En ce qui concerne l'activité enzymatique CMCase de la souche, le CMC, le cellobiose et la cellulose on donné les meilleures activités avec : 3.01 U/mg, 0.91 U/mg et 0.72 ± 0.03 U/mg respectivement. Le CMC est le substrat qui donne l'activité enzymatique la plus élevée, ce qui est aussi rapporté dans plusieurs études (Pandey et *al.*, 2013 et Shajahan et *al.*, 2017).

L'activité CMCase est notable mais faible en présence du maltose, sucrose, lactose et papier filtre et est inférieure à 0.5 U/mg. Dans le but de déterminer les conditions optimums de la production enzymatique, huit composants de milieu (variables), à savoir la carboxyméthylcellulose

(CMC), l'extrait de levure, le $MgS0^4$-$7H_2O$, le $CuSO_4H_5$-H_2O, le $CoSO_4$-$7H_2O$, le NaCl, la peptone et la température ont été criblés selon la conception de Plackett-Burman pour déterminer l'effet significatif de chaque variable sur la production d'enzyme cellulase et sur la croissance. Le résultat a révélé que tous les facteurs ont un effet significatif sur l'activité à l'exception de l'ion Mg^{2+} et de la peptone. Le tableau 25 montre également que l'intéraction AB (CMC-NaCl) et AC (CMC-Extrait de levure) est significative.

Tableau 25. Modèle factoriel sélectionné par ANOVA.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	
Model	0.91	10	0.091	309.01	0.0442	Significatif
F-Temperature	0.39	1	0.39	1320.11	0.0175	Significatif
C-[Yeast extract]	0.20	1	0.20	683.33	0.0243	Significatif
A-[CMC]	0.20	1	0.20	671.20	0.0246	Significatif
H-Co^{++}	0.11	1	0.11	384.25	0.0324	Significatif
G-[Cu^{++}]	0.11	1	0.11	370.10	0.0331	Significatif
B-[NaCl]	0.050	1	0.050	170.21	0.0487	Significatif
D-[Mg^{++}]	1.721E-003	1	1.721E-003	5.85	0.2495	Non significatif
J-peptone	3.527E-004	1	3.527E-004	1.20	0.4711	Non significatif
AB	0.13	1	0.13	458.69	0.0297	Significatif
AC	0.15	1	0.15	513.21	0.0281	Significatif

Parmi les 8 paramètres étudiés, six paramètres, à savoir la CMC, le NaCl, l'extrait de levure, la température, le Cu^{2+} et le Co^{2+}, ont un effet significatif. La carboxyméthylcellulose est le substrat par excellence pour l'expression de l'activité cellulase. Le NaCl a eu un effet positif, ce qui confirme le caractère halophile de la souche. L'activité qui est plus élevée à 30°C plutôt qu'à 37°C, est en accord avec Shivanand et *al.,* (2012) qui ont également constaté que le maintien de la température de croissance à un niveau bas pourrait améliorer la production de cellulase halophile, mais contrairement au rapport de Sreena & Sebastian (2018) qui a révélé que la production de cellulase par *Bacillus subtilis* MU S1 croissait avec l'augmentation de la température.

Deux sources d'azote organiques, l'extrait de levure et la peptone, ont été choisies, car elles ont été rapportées comme ayant un effet significatif sur la production de cellulase contrairement aux sources d'azote inorganique. Li et *al.* en 2008 ont montré que l'extrait de levure permet également une production plus élevée de cellulase alors que la peptone n'avait aucun effet significatif. Azadian et *al.* (2017) ont également signalé l'effet modéré de la peptone sur l'activité.

Trois ions métalliques ont été testés dans cette étude : Mg^{2+}, Cu^{2+} et Co^{2+}; l'ion magnésium est celui qui n'a pas d'effet significatif sur la production de cellulase, bien qu'il soit connu pour être un activateur de la production et de l'activité de la cellulase comme observé dans l'étude de De Cassia Pereira et *al.* (2017) et dans l'étude de Sreena & Sebastian (2018). Le Co^{2+} et le Cu^{2+} ont un effet significatif sur l'activité cellulase de la souche *B. subtilis* 99SS2. Le Cu^{2+} est connu pour être

un inhibiteur de l'activité de la cellulase alors que le Co^{2+} est connu pour être un inhibiteur de l'hémicellulase et peut être soit un inhibiteur ou un activateur de la cellulase selon le micro-organisme (De Cassia Pereira et *al.*, 2017).

Les facteurs : CMC, NaCl et l'extrait de levure ont été testés à différentes concentrations alors que le pH et la température ont été fixés à 7.0 et 30°C, respectivement. La figure 23 montre l'interaction de ces facteurs et l'effet positif de chaque facteur testé sur l'autre, avec (a) l'effet positif du CMC sur l'extrait de levure et (b) l'effet positif du CMC sur la concentration de NaCl.

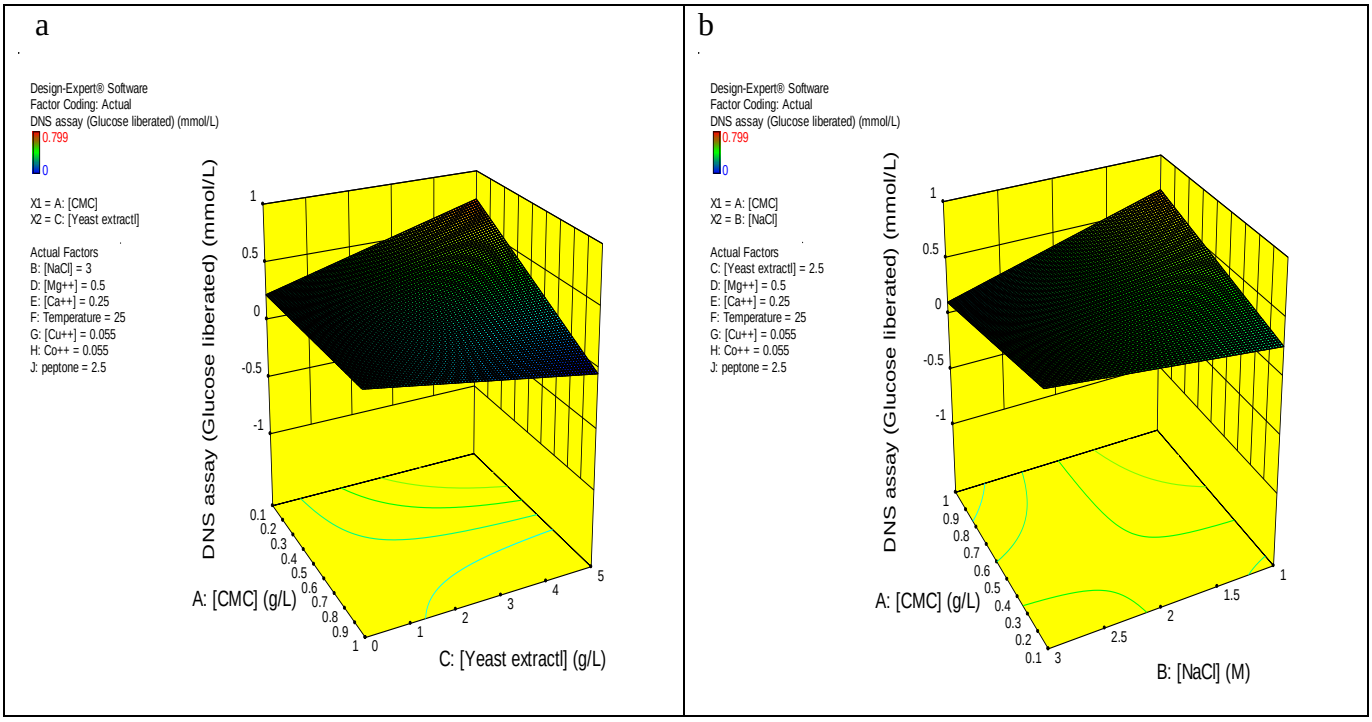


Figure 23. Surface de réponse tridimensionnelle pour la production de cellulase montrant les effets de l'interactif entre la concentration de (a) CMC et l'extrait de levure et de (b) CMC et NaCl.

Le CMC est connu pour avoir un effet inducteur sur la production de cellulase, c'est un substrat d'une importance capitale pour les espèces de *Bacillus* pour la production de cellulase. Les sources d'azote comme l'extrait de levure joue un rôle vital dans la production de cellulase. Dans cette étude, l'activité de la cellulase augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait de levure, comme le montre la figure 24 (a) de la surface de réponse 3D de l'interaction entre la CMC et l'extrait de levure. La figure 24 (b) montre l'interaction entre CMC et NaCl. Un niveau élevé de CMC et un niveau moyen à faible de NaCl sont le plus optimal pour une production élevée de cellulase.

Quatre facteurs à trois niveaux, A (CMC), B (NaCl), C (extrait de levure) et F (température) ont été sélectionnés pour l'optimisation en utilisant la conception de Box-Buhnken. L'analyse montre que les conditions permettant une activité et une croissance optimale sont :

Milieu minimum M9 initial additionné de 1.0 M de NaCl, 1 g/l de CMC et 1 g/l d'extrait de levure et incubation à 30°C

3.2. Cinétique de croissance et de production de cellulase

Les espèces de *B. subtilis* en général ont une bonne capacité d'adaptation, un taux de croissance rapide et une faible demande en nutriments, ce qui fait de *Bacillus* l'une des espèces les plus utilisées pour l'expression sécrétoire de diverses protéines (Schumann, 2007). La faible demande en nutriments a été prouvée dans la section d'optimisation. La cinétique de la croissance de la souche avec différents substrats a révélé l'effet des 3 meilleurs substrats (CMC, cellobiose et cellulose) sur la croissance et la production de cellulase et de protéines.

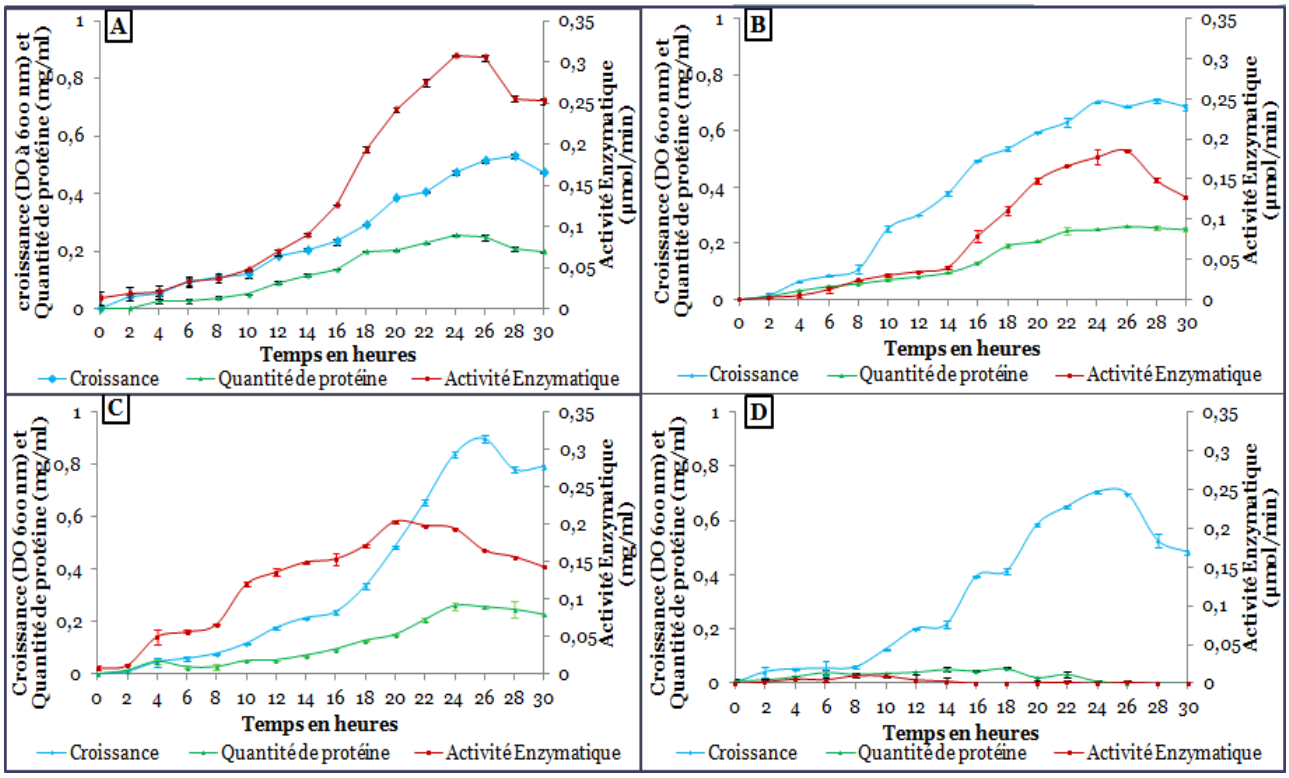


Figure 24. Cinétique de croissance, de l'activité enzymatique et de production de protéine de la souche *Bacillus subtilis* 99SS2 dans le milieu M9 additionné de 1.0 M NaCl et de substrat à 1 g/l de CMC (A), Cellulose (B), Cellobiose (C) et YE : extrait de levure (D).

En termes de croissance, la figure 24 montre un profil légèrement similaire, avec une phase de latence de 6 à 10h et une phase de déclin dès 30 heures d'incubation. Il n'y a pas d'activité cellulase dans la condition D (extrait de levure) ce qui montre que l'activité est induite par le substrat. La croissance de la souche 99SS2 dans le milieu en présence de la cellulose (B) du cellobiose (C) et de l'extrait de levure (D) est légèrement plus élevée qu'en présence du CMC (A). Pour tenter d'expliquer ceci, rappelons qu'il n'y a pas de croissance en présence du glucose (figure 23), il est possible que lors de la consommation du CMC il y a une accumulation de glucose dans le milieu de culture qui mène à une inhibition ou à un ralentissement de la croissance de la souche 99SS2.

Dans la condition (D), milieu sans source de carbone, la DO à 600 nm est de 0.7, ce qui peut être expliqué par la présence de glucide dans l'extrait de levure ou peut s'expliquer par la capacité de la souche 99SS2 à synthétiser de la matière organique à partir de la matière minérale comme le

dioxyde de carbone ou encore peut s'expliquer par la consommation d'aminoacides par la souche 99SS2 en présence d'extrait de levure. Les profils de la vitesse de croissance, de production de protéine et de production de glucose montrent une réaction différente selon le substrat. En présence du CMC (A) et de l'extrait de levure (D), la souche 99SS2 produit d'abord des protéines. S'ensuivent une augmentation de la vitesse de la croissance et une augmentation de la vitesse de production de glucose. Alors qu'avec la cellulose (B) et le cellobiose (C) comme substrats la vitesse de la croissance et de la production de protéines est très faible et il y a une augmentation de ces vitesses avec l'augmentation de la vitesse de production du glucose. Pour toutes les conditions, la vitesse des paramètres diminuent après 24 heures d'incubation qui est le début de la phase de déclin.

La cinétique nous a permis de calculer la vitesse de croissance, de production de protéines et de glucose (Figure 25).

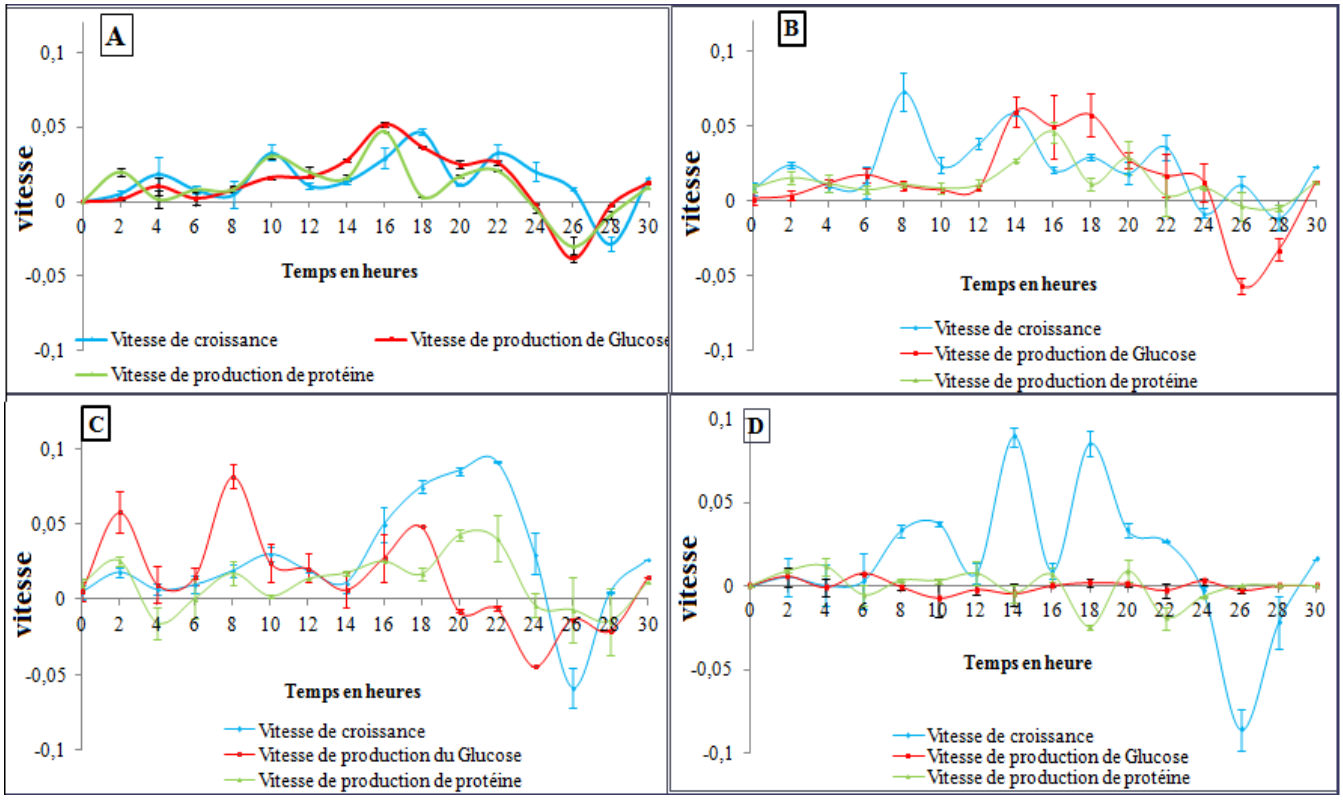


Figure 25. Cinétique de la vitesse de croissance, de production de glucose et de production de protéine de la souche *Bacillus subtilis* 99SS2 dans le milieu M9 additionné de 1.0 M de NaCl et de CMC (A), Cellulose (B), Cellobiose (C) et YE : extrait de levure (D).

3.3. Analyse de l'extrait protéique brut de B. subtilis 99SS2

3.3.1. Préparation de l'extrait protéique brut et profil protéique

La quantité de protéines de l'EPB (Tableau 26) nous a permis de déterminer la technique de précipitation par laquelle on récupère le plus de protéines.

D'après le tableau 26 et la figure 26, la meilleure technique avec le meilleur rendement est la précipitation au sulfate d'ammonium à 100%, qui sera celle utilisée pour le reste des tests.

Tableau 26. Quantité de protéine (µg) de l'extrait protéiquebrut sur CMC de la souche 99SS2 précipité par différentes techniques.

Technique de précipitation	Quantité de protéine en µg
1 = Sulfate d'ammonium 80 %	262,60 ± 1,54
2 = Sulfate d'ammonium 100%	281,67 ± 2,50
3 = Acétone 80%	196,39 ± 2,15
4 = PEG 6000 30%	76,26 ± 1,87

D'après ce tableau, on peut constater que la technique de précipitation des protéines avec le PEG 6000 à 30% de saturation ne permet de récupérer qu'une infime partie des protéines présentes dans le surgnageant (26%) en comparaison avec le sulfate d'ammonium que ce soit à 80 ou 100%.

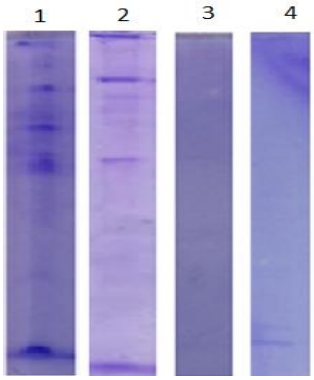


Figure 26. Gel PAGE natif de l'extrait protéique brut de la souche 99SS2 précipité par (1) Sulfate d'ammonium à 80% de saturation, (2) Sulfate d'ammonium à 100% de saturation, (3) Acétone à 80% de saturation et (4) PEG 6000 à 30% de saturation.

3.3.2. Activité enzymatique des EPB préparés à partir de différents substrats

Les extraits protéiques bruts préparés à partir de culture sur chaque substrat : CMC (EPB-CMC), cellulose (EPB-Cel), cellobiose (EPB-clb) et extrait de levure (EPB-YE) ont été analysés par PAGE (Figure 27), le profil protéique observé de chaque condition montre une différence de profil avec certaines bandes qui sont présentent dans les quatre conditions.

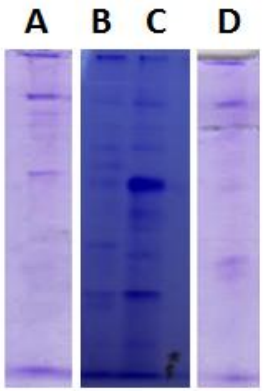


Figure 27. Gel PAGE natif des extraits protéiques bruts de *Bacillus subtilis* 99SS2 après 24 heures d'incubation à 30°C dans le milieu M9 additionné de (A) CMC, (B) Cellulose, (C) Cellobiose ou (D) Extrait de levure.

Concernant les activités enzymatiques et stabilités sur le CMC comme substrat des différents EPB, à pH 7.0 et à 60°C, la figure 28 montre que l'EPB-CMC présente l'activité la plus élevée de 0.5 U/mg enregistré durant les 30 min de réaction enzymatique, celle de l'EPB-cel et de l'EPB-clb est de 0.44 et 0.33, respectivement. L'EPB-Clb est actif sur CMC comme substrat, ceci montre qu'en plus des enzymes spécifiques au métabolisme du cellobiose qui sont des β-Glucosidases et phospho-β-Glusidases, il y aurait synthèse et production d'enzymes dégradant le CMC dont l'expression est induite par le cellobiose. L'EPB-Cel contient des enzymes dégradant la cellulose notamment les exo et les endoglucanases qui sont aussi capables de dégrader le CMC. Pour la condition EPB-YE (culture avec l'extrait de levure sans aucun substrat), comme attendu, il ne présente aucune activité CMCase (la valeur calculée est de 0.06 U/ml/mg qui est négligeable). Tous les extraits protéiques bruts obtenus sont stables pendant les 5h d'incubation (figure 28B).

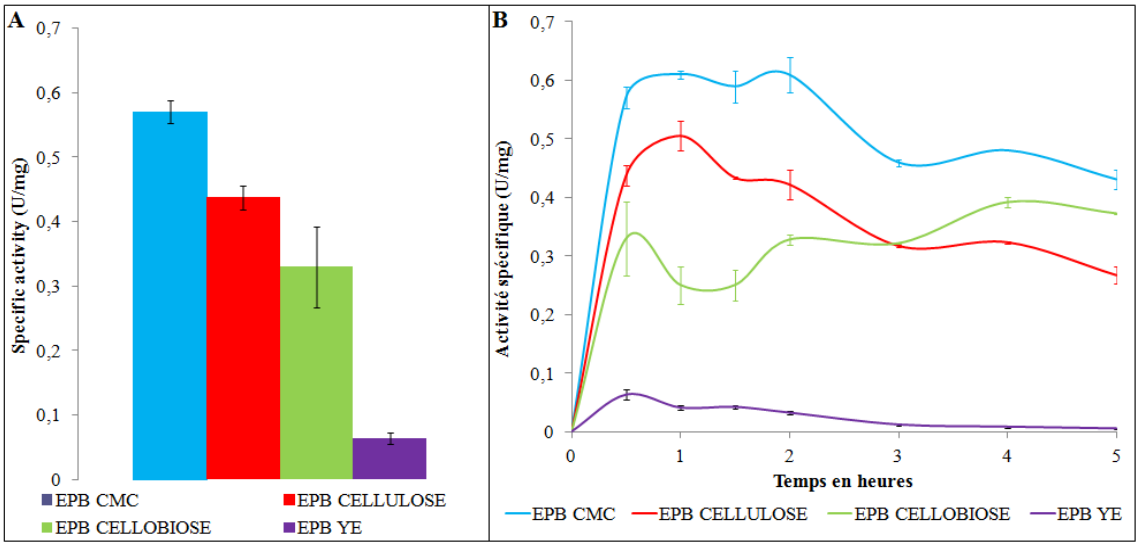


Figure 28. (A) Activité spécifique des différents EPB après 30 min de réaction enzymatique. (B) Activité spécifique des différents EPB après incubation de 0 à 5 h.

3.3.3. Caractérisation de l'EPB préparé à partir de CMC (EPB-CMC)

Toutes les expériences mentionnées ci-dessous sont réalisées avec L'EPB préparé à partir de la culture de la souche halophile modéré *Bacillus subtilis* 99SS2 avec le CMC comme substrat et qui a donné l'activité la plus élevée. EPB-CMC testé à 40 µg/ml, à 1% (p/v) de CMC, à pH 7.0 et à la température de 60°C représente notre condition-témoin, le 100% de l'activité relative.

- ***Effet de la concentration de l'EPB sur l'activité :***

Différentes concentrations de l'EPB-CMC allant de 10 µg/ml à 50 µg/ml ont été testées en termes d'activité spécifique CMCase dans un milieu réactionnel contenant 1% (p/v) de CMC, pH 7.0 et à 60°C pendant 30 min d'incubation. La figure 29 montre que (i) l'activité enzymatique en U/mg augmente avec la concentration de l'EPB-CMC et (ii) cette activité se stabilise à partir de 40 µg/ml. Cette dernière concentration est considérée comme la concentration optimale de l'EPB-CMC dans les conditions-témoins de la réation utilisée.

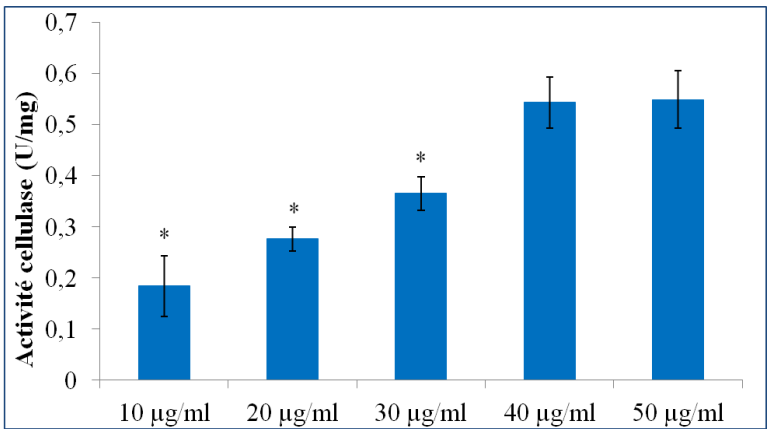


Figure 29. Activité enzymatique (U/mg) des différentes concentrations d'extrait protéiquebrut (EPB) de la souche *Bacillus subtilis* 99SS2. (*) Significatif : $p < 0.05$.

- ***Effet du substrat sur l'activité et la stabilité de l'EPB-CMC :***

L'activité cellulase de l'EPB-CMC de la souche 99SS2 est déterminée en présence des différents substrats, le carboxyméthylcellulose, la cellulose, le cellobiose et le papier filtre Whatman N°2 (figure 30).

L'EPB-CMC a montré la capacité de dégrader tous les substrats testés, y compris le papier. L'activité cellulase relative en présence des 4 substrats a montré un profil similaire avec un optimum d'activité détectée après 30 min d'incubation. Ensuite, l'activité subit une légère diminution vers 1 h d'incubation et se stabilise durant les 5 h de l'incubation.

Il est à noter qu'une augmentation de l'activité enzymatique en présence de la cellulose comme substrat est observée après 2 h d'incubation. Ceci est probablement dû à la dégradation de la cellulose mécanique qui conduit, avec le temps, à la décristallisation de la cellulose pour devenir plus accessible à l'enzyme.

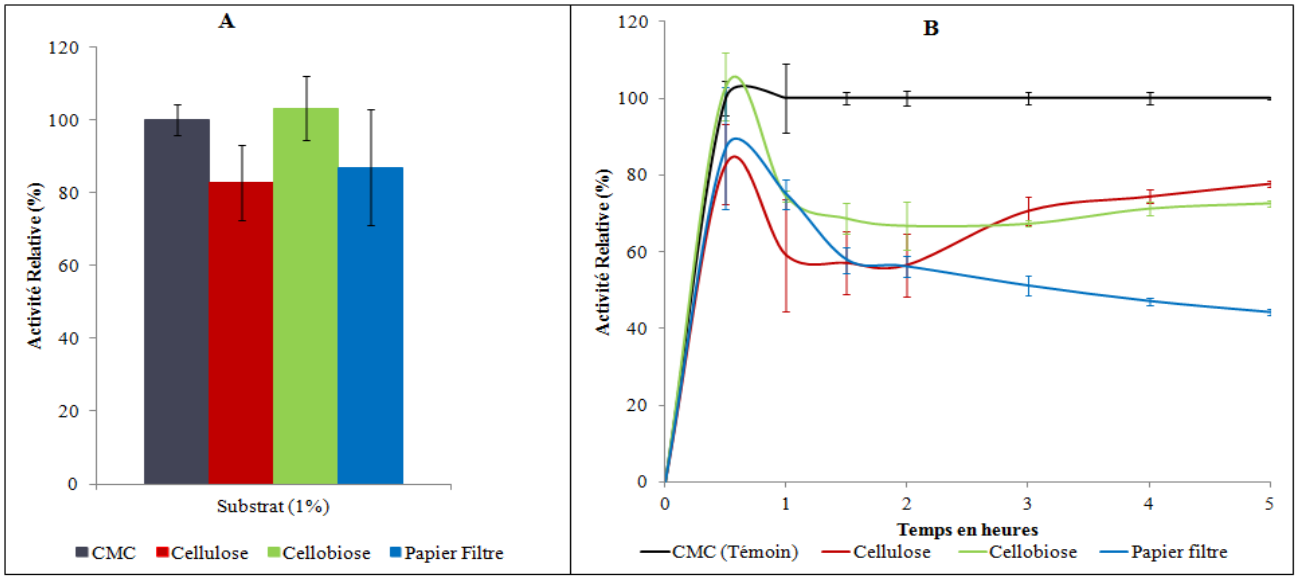


Figure 30. L'effet de différents substrats sur l'activité cellulase relative (%) de l'extrait protéiquebrut à 30 minutes (A) et (B) la stabilité de l'activité cellulase jusqu'à 5 heures d'incubation.

- ***Effet de la température sur l'activité et la stabilité de l'EPB-CMC :***

L'effet de la température sur l'activité CMCase de l'EPB-CMC a été déterminé à différentes températures allant de 10 à 80°C. La figure 31A montre qu'à 10°C, aucune activité n'est enregistrée, et dans la figure 31B l'ont remarque une légère augmentation de l'activité (±20%) après 1h30min d'incubation, qui peu être dû au temps de fixation du substrat à l'enzyme dans ces conditions.

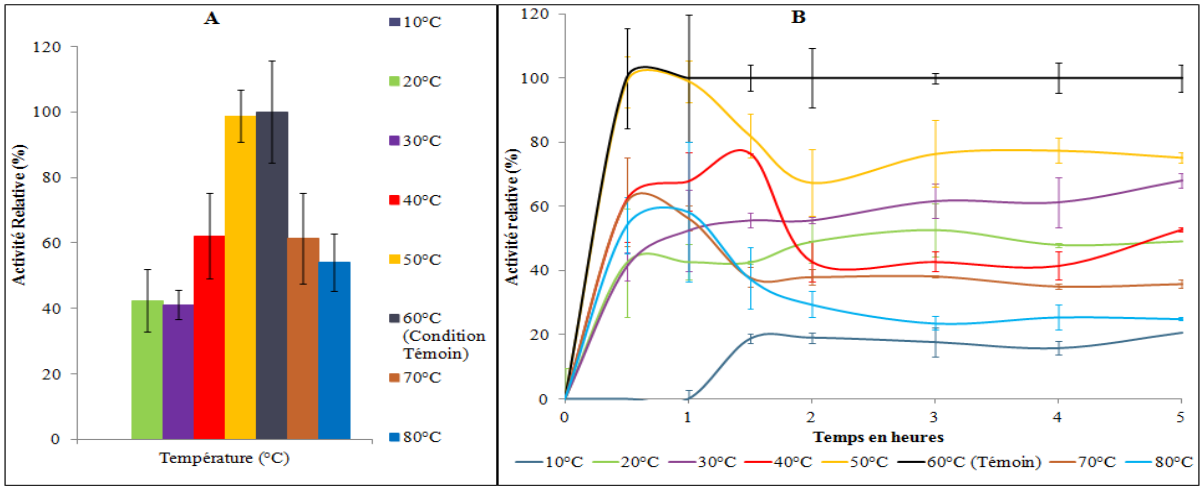


Figure 31. Effet de la température (A) sur l'activité cellulase relative (%) de l'extrait protéiquebrut et (B) sa stabilité.

En terme général l'activité augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à 60°C, puis commence à diminuer faiblement à 70 et à 80°C où l'activité relative est de 60% par rapport à la température du témoin de 60°C. Ceci montre le caractère thermotolérant de l'EPB-CMC. Il a été rapporté que les cellulases provenant des souches de *Bacillus* sont stables de 0 à 50°C (Lin et *al.*, 2012). Dans cette étude, l'optimum d'activité de l'EPB est à 60°C, ce qui est similaire aux valeurs rapportées dans la littérature pour d'autres souches de *Bacillus* (Ladeira et *al.*, 2015 ; Azadian et *al.*, 2016; Ekwaelor et *al.*, 2017).

La stabilité thermique de l'enzyme brut a également été déterminée à différentes températures allant de 10 à 80°C à pH 7.0 et avec du CMC comme substrat. On remarque (Figure 31B) qu'après deux heures d'incubation, une diminution de l'activité relative de l'enzyme brut à toutes les températures testées est observée. En raison de la nature de la thermotolérance de cette enzyme, toutes les mesures d'activité CMCase ont été déterminées à 60°C. Cependant, l'extrait protéique brut perd après 1 heure d'incubation environ 32% et 42% de son activité à 70°C et 80°C, respectivement. Cette caractéristique est avantageuse pour des enzymes telles que les cellulases pour diverses applications industrielles. D'une part, elle permet l'utilisation d'une température de traitement plus élevée, ce qui entraîne des taux de réaction plus rapides qui peuvent améliorer l'hydrolyse de la cellulose par exemple, et d'autre part, elle minimise ou elle annule les risques de contamination microbienne des organismes mésophiles (Annamalai et *al.*, 2011).

- ***Effet du pH sur l'activité et la stabilité de l'EPB-CMC :***

L'extrait protéique brut est actif et stable à toute la gamme de pH testée (Fig 32).

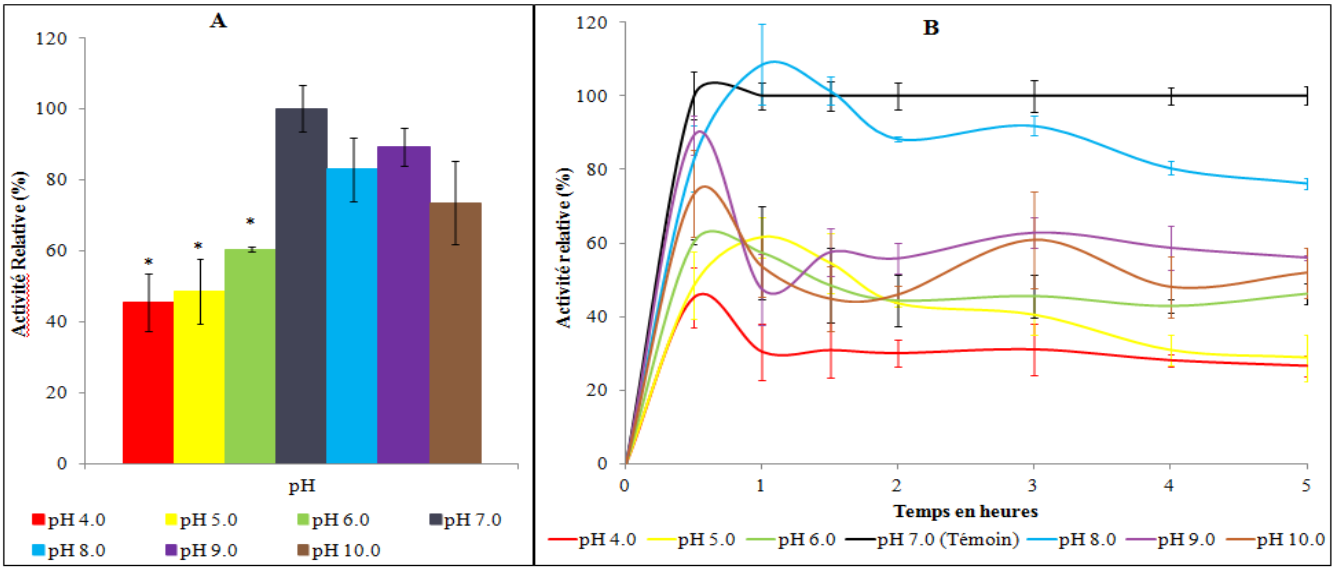


Figure 32. (A) L'effet du pH sur l'activité cellulase relative (%) de l'extrait protéiquebrut et (B) sa stabilité.

L'activité relative la plus élevée a été mesurée dans des conditions de pH 5.0 à pH 9.0, avec 65% de l'activité à pH 10.0. Les résultats de la présente étude sont similaires à une cellulase alcaline extracellulaire produite par *Bacillus licheniformis* AMF-07 (Azadian et *al.*, 2016) et *Bacillus sphaericus* CE-3 (Ekwealor et *al.*, 2017).

- ***Effet de la salinité (NaCl) sur l'activité et la stabilité de l'EPB-CMC :***

La figure 33A montre que la concentration de NaCl a un effet positif et activateur sur l'activité de l'enzyme brut qui augmente avec l'augmentation de la concentration en NaCl (de 0 à 300g/l = 5.0 M).

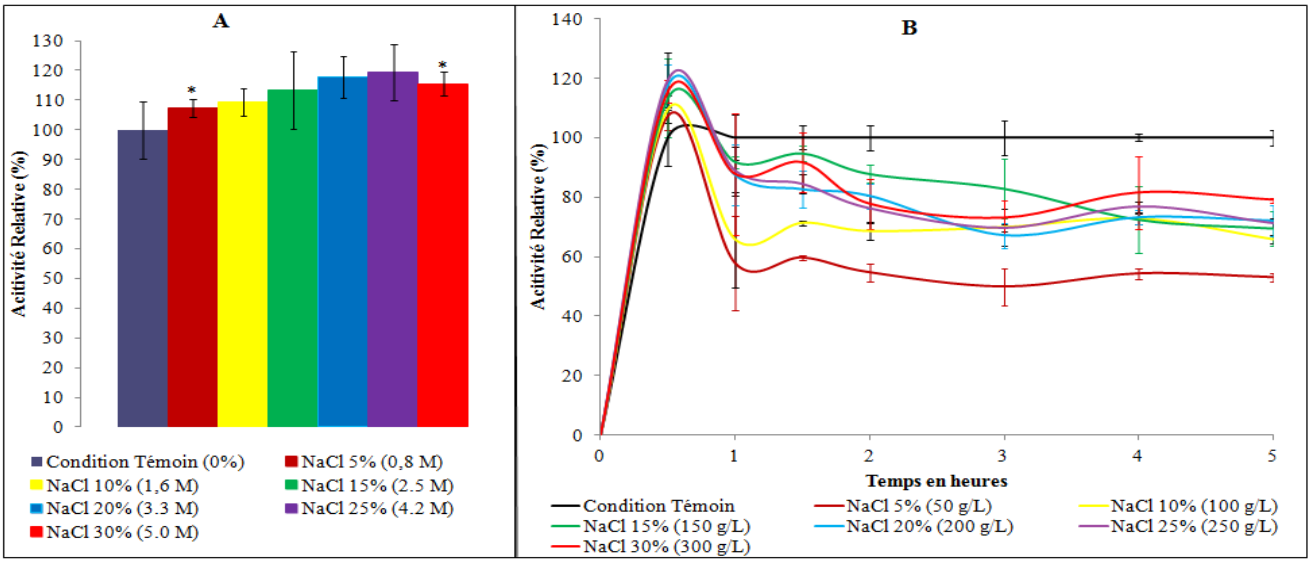


Figure 33. (A) L'effet de la salinité (NaCl) sur l'activité cellulase relative (%) de l'extrait protéique brut et (B) sa stabilité. Témoin : activité à 0 g/l (0.0 M) de NaCl.

Ce qui démontre sont halotolérance et activation par le NaCl. A la concentration en NaCl de 250 g/l, l'activité augmente de 30% après 30 min par rapport à celle enregistrée à 12 g/l de NaCl. Ce résultat montre que la cellulase de la souche *Bacillus subtilis* 99SS2 est halotolérante et active à une concentration en NaCl de 300g/l. L'optimum d'activité est enregistré à la concentration en NaCl de 250 g/l. Azadian et *al.* en 2017 ont extrait une cellulase de la souche *Bacillus sonorenis* HSC7 dont l'activité la plus élevée a été observée à 100 g/l (=1.7 M) de NaCl.

La stabilité à 250 et 300 g/l de NaCl après 5 heures n'est inférieure que de 24% à celle du contrôle (figure 33B). C'est une propriété importante et recherchée dans divers processus biotechnologiques qui dépendent de fortes salinités ou de pressions osmotiques. Ce résultat est similaire à ceux obtenus pour une CMCase de la souche HSC7 de *Bacillus sonorenis* (Azadian et *al.*, 2017) qui est active à des concentrations de NaCl de 0 à 300 g/l.

- ***Effet d'ions métalliques sur l'activité et la stabilité de l'EPB-CMC :***

En présence d'une concentration de 1 mM de Zn^{2+}, Hg^{2+} et K^{+}, une inhibition totale de l'activité a été observée (Fig 34 A et B). L'inhibition par le potassium est un facteur important qui nous permet comprendre la stratégie de la souche pour s'adapter à la forte concentration en sel de son environnement, qui est pour la souche 99SS2 la stratégie qui consiste en la biosynthèse et/ou l'accumulation de solutés organiques dans le cytoplasme qualifié de statégie « osmolyte ». Alors que l'ion manganèse augmente l'activité cellulase de l'EPB-CMC de plus de 20%.

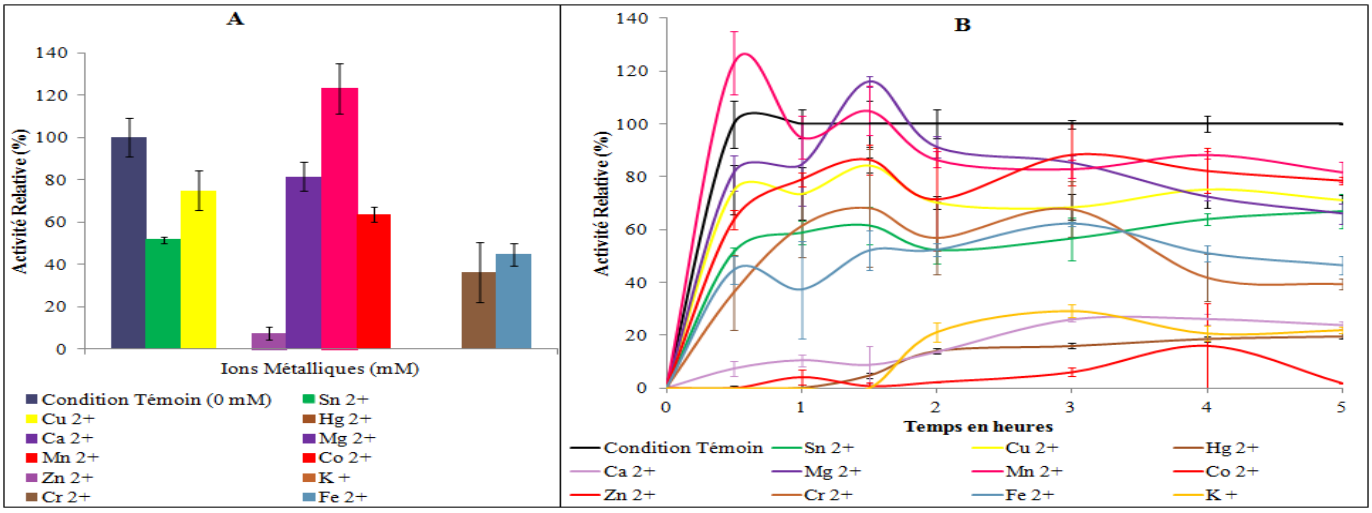


Figure 34. (A) L'effet d'ions métalliques à 1 mM sur l'activité cellulase relative (%) de l'extrait protéiquebrut et (B) sa stabilité.

La même constatation a également été rapportée par Azadian et *al.*, 2016 et Ekwealor et *al.*, 2017. Des études réalisées par De Cassia Pereira et *al.*, (2017), ont rapporté des effets inhibiteurs de Fe^{2+} et Cu^{2+} sur les activités des endoglucanases, exoglucanases et β-glucosidases. Dans cette étude, tout les ions métalliques ont diminué l'activité cellulase, le Ca^{2+} et le Hg^{2+} ont très fortement diminué l'activité sans l'inhiber complètement et les ions Zn^{2+} et K^{+} qui ont inhibé l'activité de

l'extrait protéique brut de 99SS2. L'activation et l'inhibition de l'activité cellulase par les ions métalliques de l'extrait protéique brut peuvent donner une idée de l'interaction des ions avec les résidus d'acides aminés calaytiques (De Cassia Pereira et *al.*, 2017). Le Hg^{2+} a un fort effet d'inhibition, cela peut être dû à leur interaction avec le soufre contenu dans les résidus d'acides aminés catalytiques (Tejirian & Xu, 2010). Le Mn^{2+} augmente l'activité de l'EPB, jusqu'à 122% par rapport au contrôle. Cette augmentation peut s'expliquer par l'augmentation de l'affinité de liaison du substrat-enzyme due à la présence du Mn^{2+}.

Lorsque les concentrations de Mn^{2+} augmentent, de 0 mM à 5 mM, l'activité augmente jusqu'à 120% après 30 minutes, cette activité diminue en présence de 1 et 2 mM mais reste stable jusqu'à 300 minutes d'incubation, en présence de 5 mM de Mn^{2+} nous remarquons une augmentation de l'activité cellulase de 40% après 30 minutes et qui reste stable pendant 5 heures (Figure 35).

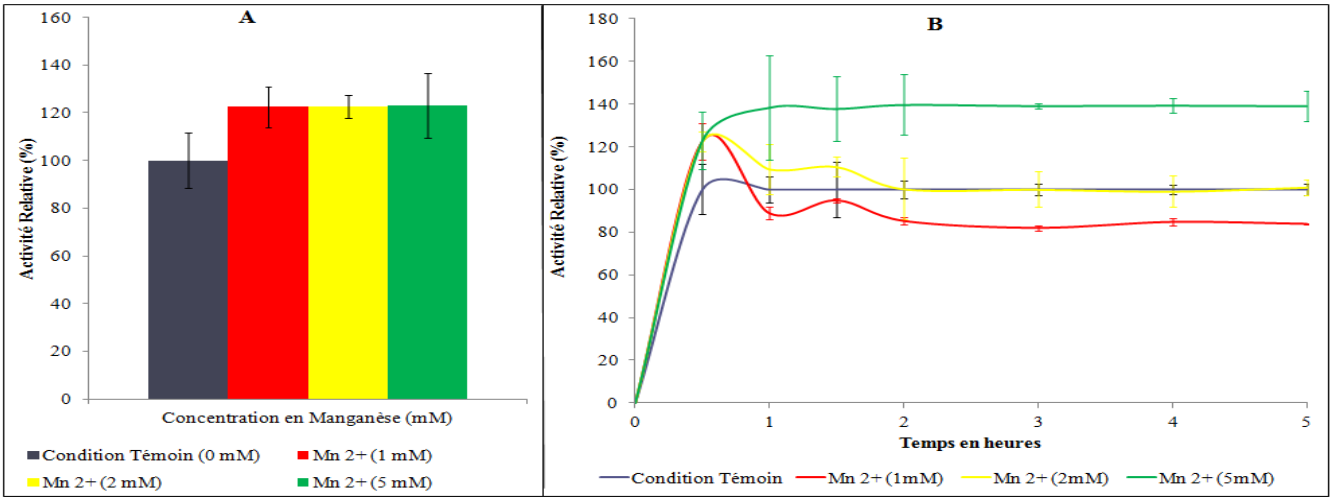


Figure 35. (A) L'effet de différentes concentrations en manganèse sur l'activité cellulase relative (%) de l'extrait protéiquebrut et (B) sa stabilité.

- ***Effet de potentiel inhibiteur ou activateur sur l'activité et la stabilité de l'EPB-CMC :***

Les cellulases alcalines halotolérantes et thermostables produites par *Bacillus subtilis* 99SS2 ont montré différents degrés d'inhibition par différents additifs. Dans cette étude, une inactivation complète a été observée en présence du méthanol. Ce qui est en contradiction avec ce qui est rapporté par Azadian et *al.*, 2016. Nous avons également observé un faible effet d'inhibition des détergents comme le Triton X-100 et SDS, mais aussi de l'EDTA, du diméthylsulfoxy (DMSO), du glycérol, de l'acéton et du B-Mercaptoethanol sur l'activité (figure 37 A).

La figure 37B montre qu'après 1 heure d'incubation dans les conditions du test, l'activité relative de l'EPB avec l'éthanol, le méthanol, le chloroforme et le triton X-100 augmente et à l'inverse l'activité relative diminue avec l'EDTA et le glycérol. Avec l'acétone, le SDS et le DMSO et le B-Mercapto-éthanol, la stabilité reste relativement la même. En présence de solvant l'augmentation de l'activité avec le temps peu être dû à l'évaporation de ces derniers dans les conditions du test (60°C).

La forte activité de l'extrait enzymatique, en présence de détergents non ioniques tels que Triton X-100 ainsi que de détergents ioniques tels que SDS, représente un avantage majeur. Les tensioactifs non ioniques aident à minimiser l'inactivation irréversible de la cellulase, modifiant ainsi sa propriété de surface pendant l'hydrolyse et, par conséquent, ils sont très avantageux pour une application dans l'industrie du papier.

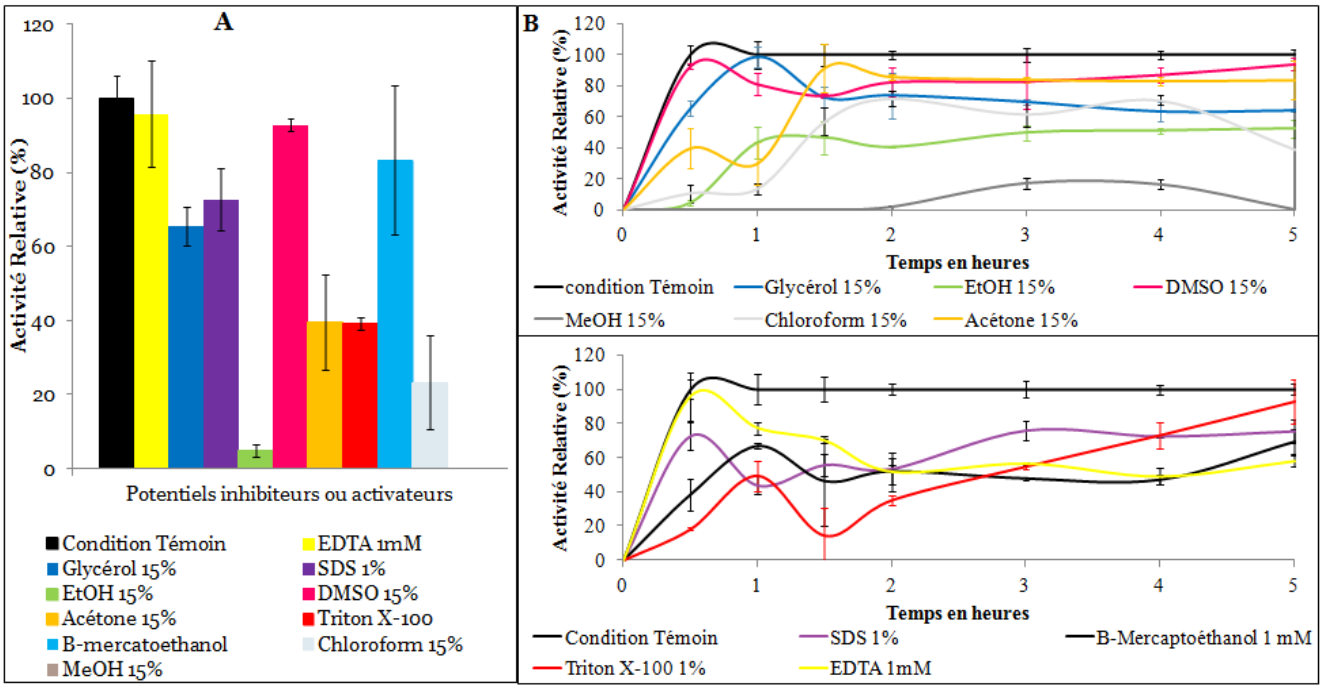


Figure 36. (A) L'effet de potentiel activateur ou inhibiteur sur l'activité cellulase relative (%) de l'extrait protéiquebrut et (B) sa stabilité.

- ***Effet des principaux activateurs sur l'activité et la stabilité de l'EPB-CMC :***

La combinaison des activateurs de l'EPB-CMC à savoir : Mn^{2+} et NaCl sur l'activité et la stabilité de l'extrait protéique brut montre une augmentation de l'activité de 20% par rapport au contrôle, avec un optimum d'activité et de stabilité à 5 mM de Mn^{2+} (Figure 37A et B).

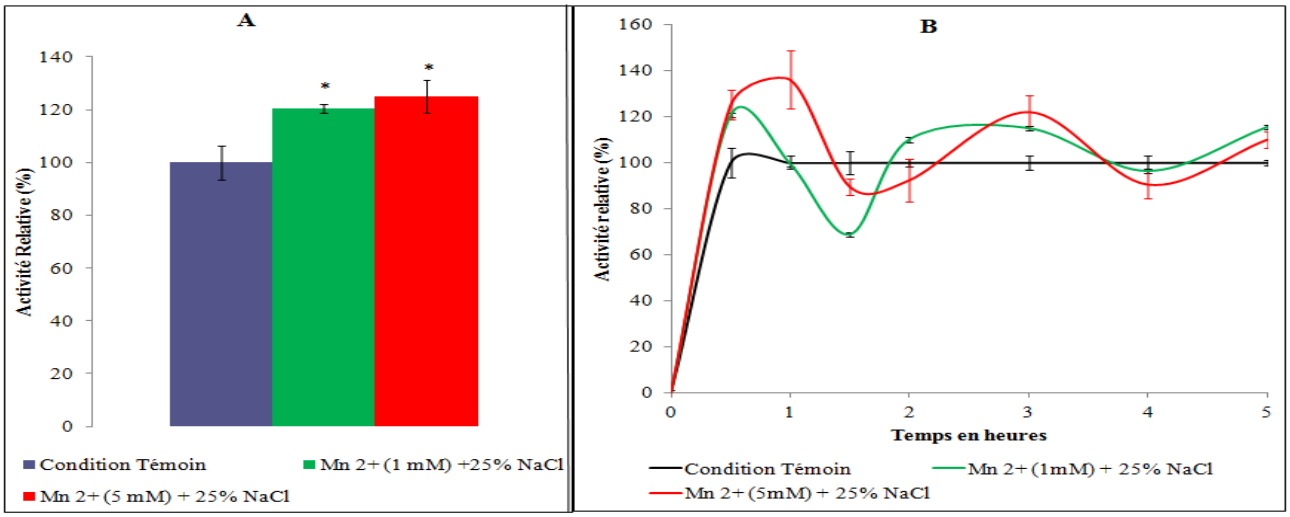


Figure 37. (A) L'effet de la combinaison des principaux activateurs sur l'activité cellulase relative (%) de l'extrait protéiquebrut et (B) sa stabilité.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les résultats ci-dessus ont indiqué l'importance du milieu de culture (solide ou liquide) et sa concentration en NaCl sur l'activité de la souche étudiée mais aussi son rôle sur l'activité et la stabilité de l'extrait protéique brut obtenu. Par exemple sur milieu gélosé à 1.0 M de NaCl la souche *Bacillus subtilis* 99SS2 est celle doté de la plus forte activité cellulase, alors que dans les mêmes conditions en milieu liquide elle est classée 3ème.

Suite au test quantitatif et qualitatif plusieurs souches de la collection ont montrées un fort potentiel producteur de cellulase, suite à une séléction de la plus performante, le producteur de la cellulase choisis a été identifié comme une souche de *Bacillus subtilis* 99SS2 et a produit de la cellulase sous un niveau minimum de substrat, ce qui est économique.

La souche 99SS2 à montrée plusieures caractéristiques singulières. Le glucose n'a pas mené a la croissance de la souche 99SS2 pour mieux comprendre ce phénomène, des tests de croissance à différentes concentrations de gluose et en présence du CMC pourrais nous permettre de mieux comprendre cette inhibition. En présence du cellibiose comme seule source de carbone dans le milieu de culture, de l'activité cellulase à été notée, un dosage de l'activité endocellulase et β glucosidase nous permetterai de vérifier ce constat et de mieux comprendre ce complexe enzymatique.

L'extrait protéique brut de la souche 99SS2 montre la capacité à dégrader la cellulose cristalline et présente des caractéristiques intéressantes : L'EPB est actif à de fortes températures (T>50°C) et stable à différents pH, il tolère la présence de divers solvants et ions métalliques. L'EPB n'est pas inhibé par certains surfactants courants. L'EPB est stable et actif de 0 à 300 g/l de NaCl, ce qui démontre son caractère halotolérant. L'effet inducteur de Mn^{2+} et la tolérance aux concentrations élevées de NaCl, présentent des propriétés unique qui fait valoir son potentiel au niveau industriel, principalement dans la pâte à papier, le cuir et le textile, qui nécessitent des conditions extrêmes de fonctionnalité. Pour confirmer le potentiel de l'EPB de la souche 99SS2, une purification de l'EPB est nécessaire pour complèter cette recherche.

Diverses perspectives sont à ajouter à ce travail sur la production de cellulase de bactérie halophile. Faire un SDS-PAGE des extraits protéiques bruts avec un marqueur de taille nous permettera d'avoir la poid moléculaire de chaque protéine et/ou enzyme doté d'activité dans ce complexe enzymatique obtenue de la souche 99SS2. Mais aussi un zymmogramme nous permetterais d'indentifier, avant de purifier, les bandes dotés d'activité cellulase. Sachant que les cellulases ont des poind moléculaire variés allant de 20 à 70 KDa selon l'espèce productrice, l'utilisation de différents boudins ou casettes de dialyse qui ont un différents seuil de rétention de molécules a poids moléculaire différents, pourrais nous permettre de récolter plus d'enzyme non récupées jusqu'ici.

Conclusion

&

Perspective Générale

La découverte des premiers micro-organismes extrêmophiles a chamboulé la science, a fait repenser le mode de fonctionnement et d'adaptabilité, et de voir les limites conventionelles de la science repoussées. Les premiers micro-organismes extrêmophiles découverts sur les rive de la Mer Morte furent les halophiles. Depuis, un nouveau monde s'est ouvert aux scientifiques, la recherche fondamentale et moléculaire du mode de fonctionnement de ces micro-organismes a ouvert de nouvelles voies à la compréhension de la vie dans l'espace. L'importance des micro-organismes halophiles a pris une toute autre proportion quand ils se sont avérés producteurs de biomolécules à fort potentiels biotechnologique. Entre autre, les enzymes d'halophiles ont plusieurs applications industrielles, de leurs mode d'action en conditions extrême et du fait que les micro-organismes sont facilement cultivables toute l'année et facilement récupérable, cela rend leurs utilisations économiques. De plus, ils évitent l'ajout d'agents toxiques et polluants. Par conséquent, leur utilisation est donc également écologique.

Dans ce contexte, ce travail a pour but d'explorer des biotopes hypersalins naturels et artificiels de la région de Fès-Meknès au Maroc et d'en isoler des bactéries halophiles afin de les valoriser par la recherche des potentiels biotechnologiques à applications industrielles.

La caractérisation des biotopes de l'étude est parmis les premières études au Maroc sur ce type d'environnement, environnement extrême salin, qu'ils soient naturels comme la mine de sel ou artificiels comme les marais salants.

L'étude de la biodiversité bactérienne halophile de ces biotopes hypersalin, nous a permis d'isoler 227 souches bactériennes halophiles, qui ont montré une grande diversité, et qui permettent de contribuer à l'enrichissement de l'inventaire des espèces bactériennes colonisant ce genre d'écosystèmes extrêmes. L'ensemble des résultats sur les biotopes de l'étude et sur la biodiversité bactérienne, confirme la complexité du microbiome et son intéraction avec son environnement. Nous avons pu montrer que la mine de sel de Fès est plus riche en termess de bactéries halophiles que les 2 sites de Taza.

La classification des isolats selon leurs halophilismes révèle la présence de 100 isolats halophiles modérées qui est la catégorie la plus représentée, 73 isolats légèrement halophiles, 35 halotolérants et 19 halophiles extrêmes. L'indentification et la caractérisation de la collection bactérienne sont réalisées par une combinaison de tests microbiologiques, biochimiques et moléculaire par séquençage de l'ADNr 16S. La majorité des isolats sont Gram positifs (147/227) dont 72 isolats sont du genre *Bacillus* (connue pour la formation de spores très résistantes). Ce qui expliquerait son caractère prédominant dans de nombreuses études. Nous avons dénombré au moins 26 genres bactériens isolés grâce à cette étude : *Bacillus, Pedobacter, Pelagicoccus, Puniceicoccus, Ureibacillus, Staphylococcus, Lentibacillus, Brevibacterium, Oceanobacillus, Sandarakinotalea, Marinicoccus, Gemella, Salinibacterium, Halorubrum, Cerasicoccus, Ulvibacter, Halomonas, Jeatgalicoccus, Marinilabilia, Exiguobacterium, Salinicoccus,*

Planomicrobium, Chthonibacter, Halobacillus, Sanguibacter et *Shewanella.* Pour une plus grande diversité, des prélèvements à d'autre période de l'année, sur des échantillons de sol plus profonds pourraient être réalisés. Les genres obtenus ont largement isolés de nombreus sites hypersalins à travers le monde et sont reconnus avoir un caractère halophile, par contre, grâce à cette étude certains genre sont décrit pour la première fois le profil halophile extrême du genre *Sanguibacter*, *Pelagicoccus* et *Oceanobacillus*.

La valorisation de cette collection bactérienne s'est faite par la recherche de production d'enzyme hydrolytique. Un criblage préliminaire des activités : cellulase, amylase, protéase, pectinase et inulinase a été réalisé sur milieu solide, à montré que 189 souches (collection bactérienne de 227 souches) sont dotées d'activités enzymatiques. Les différents substrats et les différentes techniques utilisés pour la révélation de l'activité enzymatique sur milieu gélosé, ont donné les mêmes résultats, mais une différence dans l'intensité et la clarté des halos est observée.

Les 189 souches dotées d'activité enzymatique ont été sujets à une étude quantitative dans un milieu liquide. Ce qui nous a permis de noter des différences de production entre le même genre de différents sites, pouvant montrer l'importance du biotope sur l'activité enzymatique. De fortes activités à différentes concentrations de NaCl ont été notées, notamment l'activité amylase et inulinase et de faible activité protéase ont été notés. En ce qui concerne les activités en fonction des différentes catégories d'halophilismes, les plus forte activité cellulase amylase et pectinase ont été notées pour des souches de la catégorie légérement halophile et halotolérantes, les plus forte activité protéase pour le groupes halophile modéré, et l'activité inulinase les plus forte notées pour le groupe halophile extrême. Ce qui ouvre la voie à un nouvelle axe de recherche, notamment sur l'activité inulinase à très forte concentration en NaCl. Une cinétique de production à toutes les concentrations en NaCl pourrait donné une meilleure vision du potentiel de ces souches, de leurs limites et de leurs capacités à produire des enzymes.

Toujours dans le but de valoriser les bactéries halophiles, la capacité de certains souches de la collection à produire des cellulase a été approfondie. Les souches ont été choisies d'après les résultats des tests qualitatifs et quantitatifs, et été majoritairement du genre *Bacillus* (7 souches), suivis d'une *Brevibacterium*, *Ureibacillus* et *Halomonas*. Une cinétiques de production à différentes concentrations en NaCl des souches les plus performantes nous a permis de déterminer des profils d'activité et une étude comparative des niveaux d'activités enzymatiques chez les souches testées. Pour finalement optimiser la production d'une cellulase produite par une *Bacillus subtilis* 99SS2, qui a une activité de 1.457 ± 0.31 U/mg dans un milieu minimum à seulement 1 g/l de substrat le CMC, 1.0 M NaCl et après 24h d'incubation.

Cette étude a montré qu'une activité élevée, déterminée par le dosage du surnageant de culture, ne l'est plus autant après obtention de l'extrait protéique brut. Ceci est dû probablement à la sensibilté des enzymes aux techniques d'extraction. La caractérisation de l'EPB a montré que

l'EPB possède les caractéristiques suivantes :

- Active à haute température (T=80°C),
- Active à forte salinité jusqu'à 5.5M (320 g/l de NaCl) et très stable à 5.0 M après 5h d'incubation à 60°C.
- Active en présence de certains tensio-actif (SDS)
- Active et stable en présence des ions comme le Mn^{2+}.
- Active et stable durant 5h d'incubation

Ce profil classerait cet EPB dans la catégorie d'extrait protéique prometteur et à éventuel potentiel biotechnologique qu'il faut explorer à l'échelle industrielle, ce qui ouvre la voix vers un éventuel brevet et des test à l'echelle pilote. Une purification et une identification de ou des enzymes aurait permis de compléter ce travail. C'est un des points des perspectives issues de ce travail.

Références Bibliographiques

- Aanniz T., Ouadghiri M., Melloul M., Swings J., Elfahime E., Ibijbijen J., Ismaili M. and Amar M. 2015. Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes and desert soils. Brazilian Journal of Microbiology. 42(2): 443-453. http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246220140219.
- Ahlawat S., Dhiman S.S., Battan B., Mandhan R.P. and Sharma J. 2009. Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. Process Biochemistry. 44: 521–526.
- Aino K., Hirota K., Matsuno T., Morita N., Nodasaka Y., Fujiwara T., Matsuyama H., Yoshimune K. and Yumoto I. 2008. *Bacillus polygoni* sp. Nov., a moderately halophilic, non-motile obligate alkaliphile isolated from indigo balls. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58(1): 120-124. doi:10.1099/ijs.0.65193-0.
- Al-Rubaye M.T.Sh., Al-Musawi M.H.J., Fakhari J. and Hosseini M. 2017. Screening and Characterization of Halophilic Bacteria with Industrial Enzymes from Salt Lake Razazah, Karbala, Iraq. Biosciences Biotechnology Research Asia. 14(2):531-539. http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2476.
- Amoozegar M.A., Sanchez-Porro C., Rohban R., Hajighasemi M. and Ventosa A. 2009. *Bacillus persepolensis* sp. Nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 59: 2352–2358. doi: 10.1099/ijs.0.010090-0.
- Amoozegar M.A., Bagheri M., Makhdouli A., Nikou M.M., Fazeli S.A.S., Schumann P., Spröer C., Sanchez-Porro C. and Ventosa A. 2016. *Oceanobacillus halophilus* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66: 1317-1322. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000952.
- Annamalai N., Thavasi R., Vijayalakshmi S. and Balasubramanian T. 2011. A novel Thermostable and halostable carboxymethylcellulase from marine bacterium Bacillus licheniformis AU-01. World J. Microbiol. Biotechnol. 27(9): 2111-2115. doi: 10.1007/s11274-011-0674-x.
- Anton J., Oren A., Benlloch S., Rodrigez-Valera F., Amann R. and Rossello-Mora R. 2002. Salinibacter ruber Gen. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 485-91.
- Arahal D.R., Castillo A.M., Ludwig W., Schleifer K.H. and Ventosa A. 2002. Proposal of Cobetia marina gen. nov. comb. nov., within the Family Halomonadaceae, to include the species Halomonas marina. Syst. Appl. Microbiol. 25: 207-211.
- Ardakani M.R., Poshtkouhian A., Amoozegar M.A. et al. 2012. Isolation of moderately halophilic *Pseudoalteromonas* producing extracellular hydrolytic enzymes from persian gulf. Indian. J. Microbiol. 52: 94–98.
- Arnold H.F. 2001. Combinatorial and computataional challenges for biocatalyst design, Nature. 409, pp. 253-257.
- Ayers R.S. and Westcot D.W. 1985. Water Quality for agriculture. Irrigation and Drainage paper. n°29, Édit. FAO, Rome, p 8.
- Azadian F., Badoei-Dalfard A., Namaki-Shoushtari A., Karami Z. and Hassanshahian M. (2017) Production and characterization of an acido-thermophilic, organic solvent stable cellulase from *Bacillus sonorensis* HSC7 by conversion of lignocellulosic wastes. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 15(1): 187-196. doi: 10.1016/j.jgeb.2016.12.005.
- Babavalian H., Amoozegar M.A., Pourbabaee A.A., Moghaddam M.M. and Shakeri F. 2013. Isolation and identification of moderately halophilic bacteria producing hydrolytic enzymes from the largest hypersaline playa in Iran. Microbiology. 82(4): 466-474. DOI: 10.1134/S0026261713040176.
- Bachran M., Kluge S., Lopez-Fernandez M. and Cherkouk A. 2019. Microbial diversity in an arid, naturally saline environment. Microbial Ecology. 78, 494-505; https://doi.org/10.1007/s00248-018-1301-2.
- Bajpai B., Chaudhary M. and Saxena J. 2015. Production and charactrization of α-Amylase from an Extremely halophilic Archaeon, *Haloferax sp.* HA10. Food Technology and Biotechnology. 53(1): 11-17.
- Barrett A.J. and McDonald J.K. 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. Biochem. J., 237: 935.
- Behera B.C., Sethi B.K., Mishra R.R., Dutta S.K. and Thatoi H.N. 2017. Microbial cellulases –Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment : A review. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 15: 197-210.
- Belkin S., Brenner A. and Abeliovich A. 1992. Effect of inorganic constituents on chemical oxygen demand-I. Bromides are unneutralizable by mercuric sulfate complexation. Wat. Res. 26(12): 1577-1581.
- Ben-Amotz A. and Fishler R. 1998. Analysis of carotenoids with emphasis on 9-cis-β-carotene in vegetables and fruits commonly consumed in Israel. Food Chem. 62:515–520.
- Ben-Gad D. and Gerchman Y. 2017. Reclassification of *Brevibacterium halotolerans* DSM8802 as Bacillus halotolerans comb. Nov. Based on microbial and biochemical characterization and multiple gene sequence. Curr. Microbiol. 74: 1. https://doi.org/10.1007/s00284-016-1143-4.
- Berrada I. 2012. Ph. D. thesis. Université Mohammed V – Agdal, Rabat, Maroc.
- Berrada I., Willems A., De Vos P., El fahime E.M., Swings J., Bendaou N., Melloul M. and Amar M. 2012. Diversity of culturable moderately halophilic and halotolerant bacteria in a marsh and two salterns a protected ecosystem of Lower Loukkos (Morocco). African Journal of Microbiology Research. 6(10): 2419 – 2434. DOI: 10.5897/ AJMR-11-1490.
- Bertoldo C. and Antranikian G. 2002. Starch-hydrolzing Enzymes from Thermophilic Archaea and Bacteria. Current Opinion in Chemical Biology. 6: 151-160.
- Bhat M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology Biotechnol. Adv. 18: 355–383.
- Bhatt H.B., Gohel S.D. and Singh S.P. 2018 Phylogeny, novel bacterial lineage and enzymatic potential of haloalkaliphilic bacteria from the saline coastal desert of Little Rann of Kutch, Gujarat, India. 3 Biotech. 8:53. doi: 10.1007/s13205-017-1075-0.

- Birbir M., Ogan A., Calli B. and Mertoglu B. 2004. Enzyme characteristics of extremely halophilic archaeal community in Tuzkoy Salt Mine, Turkey. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 20 : 613-621.
- Bonelo G., Ventose A., Megias M and Ruiz-Berraquero F. 1984.The sensitivity of halobacteria to entibiotics. FEMS Microbiology Letters. 21: 241-345.
- Boone D.R., Castenholz R.W. and Garrity G.M. 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume One : The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. Springer-Verlag, New York, N.Y., USA. https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6.
- Bouchotroch S., Quesada E., Del Moral A. and Béjar V. 1999. Taxonomic Study of Exopolysaccharide-producing, Moderately Halophilic Bacteria Isolated from Hypersaline Environments in Morocco. Systematic and Applied Microbiology. 22(3), 412–419.doi:10.1016/s0723-2020(99)80050-2.
- Boutaiba S., Hacene H., Bidle K.A. and Maupin-Furlow J.A. 2011. Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. Journal of Arid Environments. 75(10): 909-916. https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2011.04.010.
- Bowman J.P. 2015. *Shewanella*. In: Whitman W.B., Rainey F., Kämpfer P., Trujillo M., Chun J., DeVos P., Hedlund P. and Dedysh S. (eds) Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Chichester, UK: John Wiley & Sons. pp 1–22. doi:10.1002/9781118960608.gbm01100.
- Boyadzhieva I., Tomova I., Radchenkova N., Kambourova M., Poli A. and Vasileva-Tonkova E. 2018. Diversity of heterotrophic halophilic bacteria isolated from coastal solar salterns, Bulgaria and their ability to synthesize bioactive molecules with biotechnological impact. Microbiology. 87(4): 519-528. https://doi.org/10.1134/S0026261718040033.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72(1-2): 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Brenner D.J., Krieg N.R. and Staley J.T. 2005. Volume Two. The *Proteobacteria*. Part A. Introductory Essays. In Garrity G.M. (ed.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition. Springer-Verlag, New York: [i]-xxvi, 1-304.
- Cao J., Zheng L. and Chen S. 1992. Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of rammie. Enz. Microbiol. Technol. 14: 1013-1016.
- Cariello N.F., Swenberg J.A. and Skopek T.R. 1991. Fidelitu of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (VentTM) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis. Nucleic Acids Reasearch. 19(15): 4193-4198.
- Carr J.G. 1985. Tea, coffee and cocoa. In: Wood BJB (Ed), Microbiology of fermented foods. vol. 2. London: Elsevier Science Ltd. pp 133–54.
- Chang J., Lee Y.S., Fang S.J., et al. 2013. Recombinant expression and characterization of an organic-solvent-tolerant alpha-amylase from *Exiguobacterium sp.* DAU5. Appl. Biochem. Biotechnol. 169: 1870–1883.
- Charroud M., Cherai B., Benabdelahdi M. and Falguères C. 2007. Impact de la néotectonique quaternaire sur la dynamique sédimentaire du Saïs (Maroc) : du bassin d'avant fosse pliocène au plateau continental quaternaire. Quaternaire. 18(4): 327-33.4.
- Chen Y.G., Zhang Y., Chen Q.H., Klenk H.P., He J., Tang S., Cui X.L. and Li W.J. 2011. *Bacillus xiaoxiensis sp.* nov., a slightly halophilic bacterium isolated from non-saline forest soil. International journal of systematic and evolutionary microbiology. doi: 61. 2095-100. 10.1099/ijs.0.026286-0.
- Cheng C., Tang R.Q., Xiong L., Hector R.E., Bai F.W., Zhao X.Q. 2018. Association of improved oxidative stress tolerance and alleviation of glucose repression with superior xylose-utilization capability by a natural isolate of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Biofuels. 11: 28. Doi: 10.1186/s13068-018-1018-y.
- Chesson A. 1987. Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. In: Hresign W., Cole D.J.A., editors. Recent Advances in Animal Nutrition. London, Butterworths, pp 71-89.
- Chi Z., Chi Z., Zhang T., Liu G. and Yue L. 2009. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases, Appl. Microbiol. Biotechnol. 82: 211-220.
- Chien A., Edgar D.B. and Trela J.M. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. Journal of Bacteriology. 127(3): 1550-1557.
- Cinar I. 2005. Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids. Proc. Biochem. 40 : 945–949.
- Cojoc R., Merciu S., Popescu G., Dumitruc L., Kamekura M. and Enache M. 2009. Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal. Romanian Biotechnological Letters. 14(5): 5658-4664.
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). selon les Recommandation 2019, le lien du raport : http://sfm-microbiologie.org
- Conde-Martínez N., Acosta-González A., Díaz L.E. and Tello E. 2017. Use of a mixed culture strategy to isolate halophilic bacteria with antibacterial and cytotoxic activity from the Manaure solar saltern in Colombia. BMC Microbiology. 17 : 230. doi : https://doi.org/10.1186/s12866-017-1136-x.
- Cortes-Tolalpa L., Norder J., Van Elsas J.D. and Salles J.F. 2018. Halotolerant microbial consortia able to degrade highly recalcitrant plant biomass substrate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102(6): 2913. doi: 10.1007/s00253-017-8714-6.
- Couto S.R. and Sanromán M.A. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry- A review. Journal of Food Engineering. 76: 291-302.
- Craik C., Page M. and Madison E. 2011. Proteases as therapeutics. Biochem. J. 435: 1–17.

- Crapart S., Fardeau M.-L., Cayol J.-L., Thomas P., Sery C., Ollivier B. and Combet-Blanc Y. 2007. *Exiguobacterium profodum sp.* nov., a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 287-292. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64639-0.
- Dai X., Wang Y.-N., Wang B.-J., Liu S.-J. and Zhou Y.-G. 2005. Planomicrobium chinense sp. nov., isolated from coastal sediment, and transfer of *Planococcus psychrophilus* and *Planococcus alkanoclasticus* to *Planomicrobium* as *Planomicrobium psychrophilum* comb. nov. and *Planomicrobium alkanoclasticum* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 699-702. https://10.1099/ijs.0.63340-0.
- Davis J.S. and 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 Cassia Pereira J., Giese E.C., De Souza Moretti M.M., Dos Santos Gomes A.C., Perrone O.M., Boscolo M., Da Silva R., Gomes E. and Bocchini Martins A.D. 2017. Effect of Metal Ions, Chemical Agents and Organic Compounds on Lignocellulolytic Enzymes Activities, Enzyme Inhibitors and Activators. IntechOpen. doi: 10.5772/65934.
- Demirci A., Mutlu M.B., Güven A., Korcan E. and Güven K. 2011. Decolorization of textile azo-metal complex dyes by a halophilic bacterium isolated from Çamaltı Saltern in Turkey. Clean Soil, Air, Water. 39(2): 177–184.
- DeVos P., Hedlund P. and Dedysh S. (eds) Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Chichester, pp 1–22. doi:10.1002/9781118960608.gbm01100.
- De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. and Whitman, B. 2012. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 3: The Firmicutes. Springer-Verlag, New York, N.Y., USA. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5.
- Díaz M.P., Grigson S.J.W., Peppiatt C.J. and Burgess J.G. 2000. Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. Mar. Biotechnol. 2: 522–532. doi: 10.1007/s101260000037.
- Di Donato P., Buono A., Poli A., Finore I., Abbamondi R.G., Nicolaus B. and Lama L. 2018. Exploring Marine Environments for the Identification of Extremophiles and Their Enzymes for Sustainable and Green Bioprocesses. Sustainability. 11:149. doi: 10.3390/su11010149.
- Dinçer A.R. and Kargi F. 2001. Salt inhibition kinetics in nitrification of synthetic saline wastewater. Enzyme and Microbial Technology. 28(7–8): 661-665. doi: 10.1016/S0141-0229(01)00312-X.
- Dingle J., Reid W.W. and Solomons G.L. 1953. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. II—Application of the "Cup-plate" assay to the estimation of enzymes. Journal of the Science of Food and Agriculture. 4(3), 149–155. doi:10.1002/jsfa.2740040305.
- Diop A., Khelaifia S., Armstrong N., Labas N., Fournier P.-E., Raoult D. et al. 2016. Microbial culturomics unravels the halophilic microbiota repertoire of table salt: description of *Gracilibacillus massiliensis* sp. nov. Microb. Ecol. Health Dis. 27. e-pub ahead of print. doi: 10.3402/mehd.v27.32049.
- Djeridi I., Militon C., Grossi V. and Cuny P. 2013. Evidence for surfactant production by the haloarchaeon *Haloferax sp.* MSNC14 in hydrocarbon-containing media. Extremophiles. 17(4): 669–675.
- Douma M., Manaut N., Oudra B. and Loudiki M. 2016. First report of cyanobacterial diversity and microcystins in a *Microcystis* strain from Sidi Boughaba, a Moroccan coastal lagoon. African Journal of Aquatic Science. 41(4): 445–452.doi:10.2989/16085914.2016.1252309.
- Drissi Kaitouni L.B., Anissi J., Sendid K. and El Hassouni M. 2020. Diversity of hydrolases-producing halophilic bacteria and evaluation of their enzymatic activities in submerged cultures. Annals of Microbiology. doi : 10.1186/s13213-020-01570-z.
- Dunlap C.A., Schisler D.A., Perry E.B., Connor N., Cohan F.M. and Rooney A.P. 2017. *Bacillus swezeyi* sp. nov. and *Bacillus haynesii* sp. nov., isolated from desert soil. Int J Syst Evol Microbiol 67(8): 2720-2725. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002007.
- Dussault H.P. 1955. An improved technique for staining red halophilic bacteria. Journal of bacteriology. 70. 484-5.
- Edbeib M.F., Wahab R.A. and Huyop F. 2016. Halophiles: Biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 32: 135. doi: 10.1007/s11274-016-2081-9.
- Eisenberg H. and Wachtel E.J. 1987. Structual studies of halophilic proteins, ribosomes, and organelles of bacteria adapted to extreme salt concentrations. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 16: 69-92.
- Ekwealor C.C., Odibo F.J.C. and Onwosi C.O. 2017. Partial Purification and Characterization of Cellulase Produced by *Bacillus sphaericus* CE-3. Advances in Microbiology. 7: 293-303. doi: 10.4236/aim.2017.74024.
- El Karkouri A., Ait Assou S., El Hassouni M. 2019. Isolation and screening of actinomycetes producing antimicrobial substances from an extreme Moroccan biotope. The Pan African Medical Journal. 33: 329. doi:10.11604/pamj.2019.33.329.19018.
- Empadinhas N. and Da Costa M.S. 2008. Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes : distribution of compatible solutes. Int. Microbiol. 11(3): 151-161.
- Engelhardt M.A, Daly D., Swannell R.P.J. and Head I.M. 2001. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, Gram-positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. nov. J. Appl. Microbiol. 90: 237-247.
- Farlow W.G. 1880. On the nature of the peculiar reddening of salted codfish during the summer season. U.S. Commission of Fish and Fisheries. 969-974.
- Favela-Torres E., Volke-Sepùlveda T. and Vniegra Gonzalez G. 2006. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. Food Technol. Biotechnol. 44(2): 221-227.

- Fernandez A.B., Rasuk M.C., Visscher P.T., Contreras M., Novoa F., Poire D.G., Patterson M.M., Ventosa A. and Farias M.E. 2016. Microbial Diversity in Sediment Ecosystems (Evaporites Domes, Microbial Mats, and Crusts) of Hypersaline Laguna Tebenquiche, Salar de Atacama, Chile. Front Microbiol. 7:1284. doi: 10.3389/fmicb.2016.01284.
- Ferrera I. and Reysenbach A. 2007. Thermophiles. In eLS, (Ed.). doi :10.1002/9780470015902.a0000406.
- Flemming H.C. and Wingender J. 2001. Relevance of microbial extracellular polymeri substances (EPSs) – Part I : Structural and ecological aspects. Water Sci. Technol. 43, p. 1-8.
- Flores-Gallegos A., Delgado-García M., Ascacio-Valdés J., Villareal-Morales S., Michel-Michel M., Aguilar-González CN., Rodríguez-Herrera R. 2019. Hydrolases of Halophilic Origin With Importance for the Food Industry. In : Enzymes in Food Biotechnologie. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00013-X
- Fox G.E., Wisotzkey J.D. and Jurtshuk Jr. P. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int. J. Syst. Bacteriol. 42:166-170.
- Galinski E.A., Pfeiffer H.P., Trüper H.G. 1985. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. Eur. J. Biochem. 149(1):135-9. doi: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb08903.x.
- Gan L., Zhang H., Long X., Tian J., Wang Z., Zhang Y., Dai Y. and Tian Y. 2018. *Ornithinibacillus salinisoli* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saline-alkali soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 68:769–775. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002580.
- Gao Z., Ruan L., Chen X., Zhang Y. and Xu X. 2010. A Novel Salt-Tolerant endo-beta-1,4-Glucanase Cel5A in *Vibrio sp*. G21 Isolated From Mangrove Soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87(4): 1373-82. Doi: 10.1007/s00253-010-2554-y.
- Gaston J., Benz B., Chandrasekaran C., Satomi M., Venkateswaran K. and Hart M. 2006. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56(7): 1475-1484. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63946-0 .
- George S., Raju V., Krishnan M.R.V., Subramanian T.V. and Jayaraman K. 1995. Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. Process Biochemistry. 30(5): 457-462. doi:10.1016/0032-9592(94)00034-4.
- Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., Krieg N.R. 1994. Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington. https://doi.org/10.1002/food.19960400226.
- Ghose T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry. 59, 257-268. doi:10.1351/pac198759020257.
- Ghosh R., Chattopadhyay P.K., Chattopadhyay B and Pal D. 2010. Antibiotic resistance profile of halophilic microorganisms isolated from tannery effluent. Indian Journal of Biotechnology. 9:80-86.
- Global Industrial Enzyme Market Report. 2014. Edition 2014, Available at URL: http://www.Alliedmarket.com/enzymemarket.
- Gochnauer M.B., Leppard G.G., Komaratat P., Kates M., Novitsky T. and Kushner D.J. 1975. Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. Can. J. Microbiol. 21(10): 1500-11.
- Gohel H.R., Contractor C.N., Ghosh S.K. and Braganza V.J. 2014. A comparative study of various staining techniques for determination of extra cellular cellulase activity on Carboxy Methyl Cellulose (CMC) agar plates. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 3(5): 261-266.
- Gontang E.A., Fenical W. and Jensen P.R. 2007. Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. Appl. Environ. Microbiol. 73(10): 3272–3282. https://doi.org/10.1128/AEM.02811-06.
- Good W.A. and Hartman P.A. 1970. Properties of the amylase from *Halobacterium halobium*. J. Bacteriol. 104: 601–603.
- Graf-Rosenfellner M., Cierjacks A., Kleinschmit B. and Lang F. 2016. Soil formation and its implications for stabilization of soil organic matter in the riparian zone. Catena. 139:9-18. doi:10.1016/j.catena.2015.11.010.
- Grant W.D., Kamekura M., McGenity T.J. and Ventosa A. 2001. Class III. Halobacteria class. Nov.. In Boone DR & Castenholz RW (eds.), Vol. 1: The Archaea and the deeply Branching and Phototrophic Bacteria. In G.M. Garrity (ed.), Bergey's Manual of systematic Bacteriology, 2nd ed., Springer-Verlag, New York: 294-334.
- Grassin C. and Fauquembergue P. 1996. In: Godfrey T and West S (Eds.), Industrial Enzymology, second ed., Macmillan, UK, pp 226–4.
- Greenberg E.P. and Canale-Parola E. 1976. *Spirochaeta halophila* sp. n., a Facultative Anaerobe from a High-Salinity Pond. Arch. Microbiol. 110: 185. https://doi.org/10.1007/BF00690227.
- Guan T.W., Tang S.K., Wu J.Y., Zhi X.Y., Xu L.H., Zhang L.L. and Li W.J. 2009. *Haloglycomyces albus* gen. nov., sp. nov., a halophilic, filamentous actinomycete of the family Glycomycetaceae. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 1297-1301.
- Gupta R., Beg Q.K. and Lorenz P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 15–32.
- Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K. and Chauhan B. 2003. Microbial -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochem. 38: 1599 – 1616.
- Gupta R., Meheta G., Deswal D., Sharma S., Jain K.K., Singh A. and Kuhad R.C. 2013. In: Kuhad RC and Singh A (eds.), Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery, Chapter 6: Cellulases and Their Biotechnological Applications. pp. 89–106. doi: 10.1007/978-81-322-0876-1_6.

- Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Markov A.V., Skomarovsky A.A., Sinitsyna O.A., Berlin A.G. and Ankudimova N.V. 2000. Indigo-binding domain in cellulase molecule. Biocatalysis fundamantals and applications. 11(6): 77-80.
- Hagihara B. 1958. The enzymes, In: Boyer, P.D., Lardy, H., Myrbxck, K. (eds),. Academic Press Inc, New York.
- Hankin L., Zucker M. and Sands D.C. 1971. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. Appl. Microbiol. 22(2): 205–209.
- Haque R.U., Paradisi F. and Allers T. 2020. Haloferax volcanii for biotechnology applications : challenges, current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology. 104 : 1372-1384. https://doi.org/10.1007/s00253-019-10314-2.
- Hasper A.A., Dekkers E., Mil M.V., Van de Vondervoort P.J.I. and 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.
- Hassan H.A. and Aly A.A. 2017. Isolation and characterization of three Novel Catechol 2,3-dioxygenase from three Novel Haloalkaliphilic BTEX-degrading *Pseudomonas* strains. International Journal of Biological Macromolecules. 106: 1107-1114. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.113.
- Hauschild T., Stepanovic S. and Zakrzewska-Czerwinska J. 2010. *Staphylococcus stepanovicii* sp. nov., a novel novobiocin-resistant oxidase-positive staphylococcal species isolated from wild small mammals. Systematic and Applied Microbiology. 33(4): 183–187. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.03.004.
- Hazer B. & Steinbüchel A. 2007. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74, p. 1-12.
- Hedi A., Essghaier B., Cayol J.-L., Fardeau M.-L. and Sadfi N. 2014. Prokaryotic biodiversity of halophilic microorganisms isolated from Sehline Sebkha Salt Lake (Tunisia). African Journal of Microbiology Research. 8(4): 355-367.
- Hinteregger C. and Streichsbier F. 1997. *Halomonas sp*., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic waste-water. Biotechnology Letters. 19: 1099-1102. doi:10.1023/A:1018488410102.
- Hoondal G.S., Tiwari R.P., Tiwari R., Dahiya N. and Beg Q.K. 2000. Microbial alkaline pectinases and their applications: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59:409–18.
- Horikoshi M., Nakajima S., Masahito U and Mukaiyama T. 2011. Extremophiles handbook bioorganisms – K Japan Science and Technology Agency. Exploratory Research for Advanced Technology (ERATO). Macroscopic Quantum Control Project. 2:113–8656.
- Hou J., Jiao C., Peng B., Shen Y. and Bao X. 2016. Mutation of a regulator Ask10p improves xylose isomerase activity through up-regulation of molecular chaperones in *Saccharomyces cerevisiae*. Metab. Eng. 38: 241-50.
- Huang J., Sun B. and Zhang X. 2010. *Shewanella xiamenensis* sp. nov., isolated from coastal sea sediment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 1585-1589. https://doi.org/10.1099/ijs.0.013300-0.
- Huang T.Y., Duan K.J., Huang S.Y., Chen C. 2006. Production of polyhydroxybutyrates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. Journal of industrial microbiology & biotechnology. 33. doi: 701-6. 10.1007/s10295-006-0098-z.
- Huang Y., Dai X., He L., Wang Y., Wang B., Liu Z. and Liu S. 2005. *Sanguibacter marinus* sp. nov., isolated from coastal sediment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55(5): 1755–1758. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63471-0.
- Huang X., Shao Z., Hong Y., Lin L., Huang F., Wang H. and Liu Z. 2010. Cel8H, a novel endoglucanase from the halophilic bacterium *Halomonas sp*. S66-4: molecular cloning, hererogonous expression, and biochemical characterization. J. Miccrobiol. 48(3):318-324.
- Ivanova N., Sikorski J., Sims D., Brettin T., Detter J.C., Han C., Lapidus A., Copeland A., Glavina Del Rio T., Nolan M., Chen F., Lucas S., Tice H., Cheng J., Bruce D., Goodwin L., Pitluck S., Pati A., Mavromatis K., Chen A., Palaniappan K., D'haeseleer P., Chain P., Bristow J., Eisen J., Markowitz V., Hugenholtz P., Göker M., Pukall R., Klenk H. and Kyrpides N. 2009. Complete genome sequence of *Sanguibacter keddieii* type strain (ST-74T). Standards in Genomic Sciences. 1(2): 110-118. https://doi.org/10.4056/sigs16197.
- Javad Hamedi, Fatemeh Mohammadipanah and Hamed Kazemi Shariat Panahi. 2015. Chapter 3: Biotechnological Exploitation of Actinobacterial Members. In: Maheshwari DK. Halophiles Biodiversity and Sustainable Exploitation. Springer, Udaipur, Rajasthan, India, pp 92.
- Jayani R.S., Saxena S. and Gupta R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. Process Biochem. 40: 2931-2944.
- Jeffries C.D., Holtman D.F. and Guse D.G. 1957. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. J. Bacteriol. 73: 590–591.
- Jeong D.-W., Kim H.-R., Han S., Jeon C.O. and Lee J.-H. 2013. A proposal to unify two subspecies of *Staphylococcus equorum*: *Staphylococcus equorum* subsp. equorum and *Staphylococcus equorum* subsp. linens. Antonie van Leeuwenhoek. 104(6), 1049–1062. https://doi.org/10.1007/s10482-013-0025-z .
- Johnson J., Sudheer P.D.V.N., Yang Y.H., Kim Y.G. and Choi K.Y. 2017. Hydrolytic activities of hydrolases enzymes from halophilic microorganisms, Biotechnology and Bioprocess Engineering. 22: 450-461. doi : 10.1007/s12257-017-0113-4.
- José M. Pastor, Manuel Salvador, Montserrat Argandoña, Vicente Bernal, Mercedes Reina-Bueno, Laszlo N. Csonka, José L. Iborra, Carmen Vargas, Joaquín J. Nieto, Manuel Cánovas. 2010. Ectoines in cell stress protection : Uses and biotechnological production. Biotechnology Advances. 28, 782-801.
- Joshi M., Nerurkar M., Badhe P. and Adivarekar R. 2013. Scouring of cotton using marine pectinase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 98: 106–113. doi:10.1016/j.molcatb.2013.10.010.

- Jung Y., Kang S., Oh T., Yoon J. and Kim J. 2009. *Planomicrobium flavidum* sp. nov., isolated from a marine solar saltern, and transfer of *Planococcus stackebrandtii* Mayilraj et al. 2005 to the genus *Planomicrobium* as *Planomicrobium stackebrandtii* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59(12): 2929-2933. https://doi.org/10.1099/ijs.0.009191-0.
- Kalwasinska A., Jankiewicz U., Felföldi T., Burkowska A. and Brzezinska M.S. 2018. Alkaline and Halophilic Protease Production by *Bacillus luteus* H11 and Its Potential Industrial Applications. Food Technol. Biotechnol. 56(4): 553-561. doi: 10.17113/ftb.56.04.18.5553.
- Kamekura M., Hamakawa T. and 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.
- Kango N. and Jain S.C. 2011. Production and properties of microbial inulinases: Recent advances. Food Biotechnol. 25:165-212.
- Kannan N. 2002. Laboratory manual in general microbiology, 1st ed. Panima Publishing Corporation. pp. 133-135.
- Karan R., Singh S.P., Kapoor S. and Khare S.K. 2011. A novel organic solvent tolerant protease from a newly isolated *Geomicrobium* sp. EMB2 (MTCC 10310): production optimization by response surface methodology. New Biotechnology. 28(2):136-45. doi: 10.1016/j.nbt.2010.10.007.
- Karbalaei-Heidari H.R., Ziaee A.-A., Schaller J. and Amoozegar M.A. 2007. Purification and characterization of an extracellular haloalkaline protease produced byhe moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. Enzyme and Microbial Technology. 40: 266-272. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.04.006.
- Karbalaei-Heidari H.R., Amoozegar M.A., Hajighasemi M., Ziaee A.-A. and Ventosa A. 2009. Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis.* J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36: 21-27. doi: 10.1007/s10295-008-0466-y.
- Kharroub K. 2007. Identification et etude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzeloul (Ain M'Lila). Ph. D. thesis. Université Mentouri, Constantine, Algérie.
- Khunt M., Pandhi N. and Rana A. 2011. Amylase from moderate halophiles isolated from wild ass excreta. Int. J. Pharm. Bio. Sci. 1, 586 - 592.
- Kim I., Lee M., Jung S., Song J., Oh T. and Yoon J. 2005. *Exiguobacterium aesuarii* sp. nov. and *Exiguobacterium marinum* sp. nov., isolated from a tidal of the Yellow Sea in Korea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55(2): 885-889. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63308-0.
- Kim S.W., Kim D.U., Kim J.K., Kang L.W. and Cho H.S. 2008. Crystal structure of Pfu, the high fidelity DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*. International Journal of Biological Macromolecules. 42(4): 356-361. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2008.01.010.
- Kiran K.K. and Chandra T.S. 2008. Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic *Bacillus* sp. Strain TSCVKK. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77: 1023–1031.
- Kloos W.E. and Schleifer K.H. 1975. Isolation and characterization of Staphylococci from Human Skin. Int. J. Syst. Bact. 25(1): 62-79.
- Kloos W.E., Schleifer K.H. and Smith R. 1976. Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov. and its subspecies. Int. J. Syst. Bact. 26(1): 22-37. https://doi.org/10.1099/00207713-26-1-22.
- Krieg N.R., Ludwig W., Whitman W.B., Hedlund B.P., Paster B.J., Staley J.T., Ward N.L. and Brown D.R. 2012. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer, New York, N.Y., USA. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68572-4.
- Kristjansson J.K. and Hreggvidson G.O. 1995. Ecology and habitats of extremophiles. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 11: 17. doi: 10.1007/BF00339134.
- Kumar S., Karan R., Kapoor S., Singh S.P. and Khare S.K. 2012. Screening and isolation of halophilic bacteria producing bacteria producing industrially important enzymes. Brazilian Journal of Microbiology. 1595-1603.
- Kumar N.S., Devi S.P.S. and Nair A.S. 2016. A review on microbial proteases. International Journal of Advanced Research. 4(7): 2048-2053. doi:10.21474/IJAR01/1091.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol. 35(6): 1547-1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096.
- Kumar S., Morya V. and Datta B. 2019. Chapter 45 - Application of Nanobiocatalysts on Food Waste. pp 785–793. In: Kuddus M (ed) Enzymes in Food Biotechnology. Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-813280-7.00045-1.
- Kushner D. and Kamekura M. 1988. Physiology of halophilic eubacteria. Halophilic Bact. 1:87–103.
- Küster E. and Williams S.T. 1964. Selection of media for isolation of Streptomycetes. Nature. 202: 928–929.
- Ladeira S.A., Cruz E., Delatorre A.B., Barbosa J.B. and Martins M.L.L. 2015. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. Electronic Journal of Biotechnology. 18:110-115. doi: 10.1016/j.ejbt.2014.12.008.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680 – 685. doi: 10.1038/227680a0.
- Lai M.C. and Gunsalus R.P. 1992. Glycine betaine and potassium ion are the major compatible solutes in the extremely halophilic methanogen *Methanohalophilus* strain Z7302. J. Bacteriol. 174: 7474.
- Lanyi J.K. 1974. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. Bacteriol. Rev. 38:272.
- Larsen H. 1973. The Halobacteria's confusion to biology. The fourth A. J. Kluyver memorial lecture. Antonie van Leeuwenhoek, 39: 383-396.Kushner D, Kamekura M (1988) Physiology of halophilic eubacteria. Halophilic Bact. 1:87–103.

- Le Borgne S., Paniagua D. and Vazquez-Duhalt R. 2008. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. Journal of Microbiology and Biotechnology. 15: 74-92.
- Lee S.D. 2008. *Brevibacterium marinum* sp. nov., isolated from seawater. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 500-504. doi: 10.1099/ijs.0.65099-0.

- Lee H.-S. 2013. Diversity of Halophilic Archaea in Fermented Foods and Human Intestines and Their Application. Journal of Microbiology and Biotechnology. 23(12à: 1645-1653. https://doi.org/10.4014/jmb.1308.08015.
- Lentzen Z. and Schwarz T. 2006. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72(4): 623-634.
- Li Z., Bai Z., Zhang B., Xie H., Hu Q., Hao C., Xue W. and Zhang H. 2005. Newly isolated *Bacillus gibsonii* S-2 capable of using sugar beet pulp for alkaline pectinase production. World J. Microb. Biot. 21: 1483-1486.
- Li W., Zhang W.W., Yang M.M. and Chen Y.L. 2008. Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli.* Molecular Biotechnology. 40(2): 195–201. doi: 10.1007/s12033-008-9079-y.
- Li A.X., Guo L.Z., Fu Q. and Lu W.D. 2011. A sample and rapid plate assay for screening of inulin-degrading microorganisms using Lugol's iodine solution. Afr. J. Biotechnol. 10(46): 9518-9521. https://doi.org/10.5897/AJB11.1367.
- Li X. and Yu H.Y. 2012. Characterization of an organic solvent-tolerant α-amylase from a halophilic isolate, *Thalassobacillus sp.* LY18. Folia Microbiol. 57: 447453.
- Li X and Yu HY (2013) Characterization of a halostable endoglucanase with organic solvent-tolerant property from *Haloarcula sp*. G10. Int. J. Biol. Macromol. 62:101–106.
- Li Q., Yi L., Marek P. and Iverson B.L. 2013. Commercial proteases: Present and future. FEBS Letters. 587: 1155–1163.
- Lin L., Kan X., Yan H. and Wang D. 2012. Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. Electron J. Biotechnol. 5 (3). doi: 10.2225.
- Liu C., Baffoe D.K. and Zhang M. 2019. Halophile, an essential platform for bioproduction, Journal of Microbiological Methods. https://doi.org/ 10.1016/j.mimet.2019.105704.
- Liu Y., Lia Q., Du J. and Shoa Z. 2016. *Bacillus zhangzhouensis* sp. nov. and *Bacillus australimaris* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66(3): 1193-1199. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000856.
- Lombard V., Golaconda Ramulu H., Drula E., Coutinho P.M. and Henrissat B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 Nucleic Acids Research. 42(1): 490–495.
- Lopetcharat K., Choi Y.J., Park J.W. and Daeschel M.A. 2001. Fish sauce products and manufacturing, a review. Food Rev. Int. 17: 65-88.
- Ludwig W., Schleifer K.H. and Whitman W.B. 2008. Revised road map to the phylum Firmicutes. In: de Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H. and Whitman W.B. (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. and Pretorius I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Microbial and Molecular biology Reviews. 66(3): 506–577.
- Makhdoumi-Kakhki M.A., Ammozegar M.A. and Mahmodi Khaledi E. 2011. Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaeal strains isolated from salt lake. Int. J. Environ. Sci. Tech. 8(4): 705-714.
- Mala B.R., Aparna M.T., Mohini S.G. and Vasanti V.D. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 597-635.
- Mangesi L. and Zakarija-Grkovic I. 2016. Treatments of breast engorgement during lactation. Cohrane Database of Systematic Reviews. Doi :10.1002/14651858.cd006946.pub3.
- Marquez M.C., Ventosa A. and Ruiz-Berraquero F.A. 1987. A Taxonomic Study of Heterotrophic Halophilic and Non-halophilic Bacteria from a Solar Saltern. J. Gen. Microbiol. 133: 45-56. https://doi.org/10.1099/00221287-133-1-45.
- Maruthiah T., Esakkiraj P., Prabakaran G., Palavesam A. and Immanuel G. 2013. Purification and characterization of moderately halophilic alkaline serine protease from marine *Bacillus subtilis* AP-MSU 6. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2 (2): 116-119. doi:10.1016/j.bcab.2013.03.001.
- Marwan W. and Oesterhelt D. 1991. Light-induced release of the switch factor during photophobic response of *Halobacterium halobium*, Naturewiss. 78, 127-129.
- Mayilraj S., Prasad G.S., Suresh K., Saini H.S., Shivaji S. and Chakrabarti T. 2005. *Planococcus* stackebrandtii sp. nov., isolated from a cold desert of the Himalayas, India. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 91–94. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63290-0.
- Meenakshi S., Umayaparvathi S., Manivasagan P., Arumugam M. and Balasubramanian T. 2013. Purification and characterization of Inulinase from marine bacterium, *Bacillus cereus* MU-31. Indian Journal of Geo-Marine Sciences. 42(4): 510-515.
- Mei Y., Chan Y., Zhai R. and Liu Y. 2013. Cloning, purification and biochemical properties of thermostable pectinase from *Bacillus halodurans* M29. Journal of Molecular CaralysisB: Enzymatic. 94:77-81.
- Menasria T., Aguilera M., Hocine H., Benammar L., Ayachi A., Si Bachir A., Dekak A. and Monteoliva-Sanchez M. 2018. Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. Microbiological Research. 207:289-298. doi:10.1016/j.micres.2017.12.011.
- Menasria T., Monteoliva-Sanchez M., Benammar L., Benhadj M., Ayachi A., Hacène H., Gonzalez-Parades A. and

Aguilera M. 2019. Culturable halophilic bacteria inhabitinf Algerian salin ecosystems : A source of promising features and potentialities. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 35:132. https://doi.org/10.1007/s11274-019-2705-y.
- Michard A., Mokhtari A., Chalouan A., Saddiqi O., Rossi P. and Jimati E.-C. 2014. New ophiolite slivers in the External Rif belt, and tentative restoration of a dual Tethyan suture in the western Maghrebides. Bull. Soc. géol. France. t. 185, no 5, pp. 313-328.
- Michelin M., Silva T.M., Benassi V.M., Peixoto-Nogueira S.C., Moraes L.A., Leao J.M., Jorge J.A., Terenzi H.F. and Polizeli M. 2010. Purification and characterization of a thermostable α-amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. Carbohydr. Res. 345 (16): 2348-2353.
- Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31(3): 426–428. https://doi.org/10.1021/ac60147a030.
- Mishra S. and Behera N. 2008. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving kitchen wastes. Afr. J. Biotechnol. 7(18): 3326-3331. https://doi.org/10.5897/AJB08.582.
- Mojovic L., Nikolic S., Rakin M. & Vukasinovic M. 2006. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. Fuel. 85(12–13): 1750–1755.
- Mohandas A., Raveendran S., Parameswaran B., Abraham A., Athira R.S., Mathew A.K. and Pandey A. 2018. Production of pectinase from *Bacillus sonorensis* MPTD1. Food Technology and Biotechnology. 56(1): 110.
- Moniri M., Moghaddam A.B., Azizi S., Rahim R.A., Bin Ariff A.A., Saad W.Z., Navaderi M. and Mohamad R. 2017. Production and status of bacterial cellulose in biomedical engineering. Nanomaterials. 7(9): 257. doi: 10.3390/nano7090257.
- Montoroi J.P. 1997. Electrical conductivity of soil solution and soil aqueous extracts: case of a saline acid sulphate soil in Lower Casamance (Senegal). Etude et Gestion des Sols. 4(4): 279-298.
- Morvan J. 2010. Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires M55B. http://www.frost.com.
- Nakamura L.K. 1989. Taxonomic relationship of Black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for Bacillus atrophaeus sp. Nov. International Journal of Systematic Bacteriology 39(3): 295-300.
- Namwong S., Tanasupawat S., Lee K. and Lee J. 2009. *Oceanobacillus kapialis* sp. Nov., from fermente shrimp paste in Thailand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59(9): 2254-2259. https://doi.org/10.1099/ijs.0.007161-0.
- Nazarenko E.L., Komandrova N.A., Gorshkova R.P., Tomshich S.V., Zubkov V.A., Kilcoyne M. and Savage A.V. 2003. Structures of polysaccharides and oligosaccharides of some Gram-negative marine Proteobacteria. Carbohydr. Res. 338, p. 2449-2457.
- Noberg P. and Von Hofstn B. 1969. Proteolytic Enzymes from Extremely Halophilic bacteria. Journal of general microbiology. 55(2):251-6. DOI: 10.1099/00221287-55-2-251.
- Nübel U., Garcia-Pichel F. and Muyzer G. 2000. The halotolerance an phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (spirulina Turpin) and the description of *Halospirulina tapeticola* gen. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 1265-1277.
- Ogan A., Danis O., Gozuacik A., Cakmar E. and Birbir M. 2012. Production of cellulase by immobilized whole cells of *Haloarcula*. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 48:440–443.
- Olsen H.S.O. and Falholt P. 1998. The Role of Enzymes in Modern Detergency. Journal of Surfactants and Detergents. 1: 555–567.
- Onsori H., Zamani M.R., Motallbei M. and Zarghami N. 2005. Identification of over producing strain of endo-β-1, 4-glucanase in *Aspergillus* species: characterization of crude carboxymethyl cellulose. African. J. Biotechnol. 4 (1): 26-30.
- Oren A. 1994. The ecology of extremely halophilic archaea. FEMS Microbiol Rev. 13: 415– 440.
- Oren A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. Microbiology and molecular biology reviews. 63: 334-48.
- Oren A. & Ventosa A. 1999. Benjamin Elazari Volcani (1915-1999): Sixty-three years of studies of the microbiology of the Dead Sea. INTERNATL. MICROBIOL. 2:195–198.
- Oren A. 2001. The order Haloanaerobiales. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. and Stackebrandt E. (Eds.), The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, 3rd ed. Springer -Verlag, New York (Electronic publication).
- Oren A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 28(1): 56–63.
- Oren A. 2004. A proposal for further integration of the cyanibacteria under the Bacteriological Code. Int. J. Syst. Evolut. Microbiology. 54 (5), 1895-1902.
- Oren A. 2006. Life at high salt concentrations. In: The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry Volume 2. Edited by: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. and Stackebrandt E. New York: Springer, 263-282.
- Oren A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. Saline Systems. 4(2):1-13.
- Oren A. 2011. Diversity of halophiles. In: Horikoshi K., Antranikian G., Bull A.T., Robb F.T. and Stetter K.O. (eds) Extremophiles handbook. Springer Japan, Tokyo, pp 309–325.
- Oren A. 2015. Halophilic microbial communities and their environments. Curr. Opin. Biotechnol. 33: 119-24. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.005.

- Pandey S., Singh S., Yadav A.N., Nain L. and Saxena A.N. 2013. Phylogenetic Diversity and Characterization of Novel and Efficient Cellulase Producing Bacterial Isolates from Various Extreme Environments, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 77(7): 1474-1480. doi: 10.1271/bbb.130121.
- Pascual C., Collins M.D., Grimont P.A.D., Dominguez L. and Fernandez-Garayzabal J.F. 1996. *Sanguibacter inulinus* sp. nov. Int. J. Syst. Bact. 811-813.
- Pazur J.H. and Ando T. 1960. The hydrolysis of glucosyl oligosaccharides with α-D- (1→4) and α-D-(1→6) bonds by fungal amyloglucosidase. Journal of Biological Chemistry. 235(2): 297–302.
- Quadri I., Hassani I.I., L'Haridon S., Chalopin M., Hacène H. and Jebbar M. 2016. Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environments of the algerian Sahara. Microbiological Research. 186(187): 119-131.
- Quillaguaman J., Delgado O., Mattiasson B. and Hatti-Kaul R. 2006. Poly(β-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. Enzyme and Microbial Technology. 38. 148-154. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.05.013.
- Rabe J.H., Mamelak A.J., McElgunn P.J.S., Morison W.L. and Sauder D.N. 2006. Photoaging: mechanisms and repair. J. Am. Acad. Dermatol. 55:1-19.
- Raddadi N., Cherif A., Daffonchio D., Neifar M. and Fava F. 2015. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes, Applied Microbiology and Biotechnology. 99, 7907-7913. DOI: 10.1007/s00253-015-6874-9.
- Rafai A. and Raji M. 2017. First evidence of mafic rocks in the prerif sub-domain (External Rifn Morocco): Cartography and Petrography. Int. J. Adv. Res. 5(9) : 1597-1610.
- Raichand R., Pareek S., Singh N.K. and Mayilraj S. 2012. *Exiguobacteriul aquaticum* sp. nov., a member of the genius *Exiguobacterium*. International Journal of Systematic and Evolutionary Mirobiology. 62: 2150-2155. doi: 10.1099/ijs.0.035790-0.
- Rajendran R., Karthik Sundaram S., Radhai R. and Rajapriya P. 2011. Bioscouring of Cotton Fabrics using Pectinase Enzyme its Optimization and Comparison with Conventional scouring Process. Pakistan Journal of Biological Sciences. 14(9): 519-525. Doi: 10.3923/pjbs.2011.519.525.
- Ramos C.P. and Fernández-Garayzábal J.F. 2015. *Sanguibacter*. In: Whitman W.B., Rainey F., Kämpfer P., Trujillo M., Chun J., DeVos P., Hedlund B. and Dedysh S. (eds) Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Chichester, UK: John Wiley & Sons, pp 1–9. doi:10.1002/9781118960608.gbm00137.
- Rani K., Rana R. and Datt S. 2012. Review on latest overview of proteases. International Journal of Current Life Sciencs. 2(1): 12-18.
- Rehman H.U., Aman A., Zohra R.R. and Qader S.A.U. 2014. Immobilization of pectin degrading enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21 using agar-agar as a support. Carbohydr. Polym. 102: 622–626.
- Reiner K. 2010. Catalase Test Protocol. American Society for Microbiology.
- Remonsellez F., Castro-Severyn J., Pardo-Esté C., Aguilar P., Fortt J., Salinas C., Barahona S., León J., Fuentes B., Areche C., Hernández K.L., Aguayo D. and Saavedra C.P. 2018. Characterization and Salt Response in Recurrent Halotolerant *Exiguobacterium* sp. SH31 Isolated From Sediments of Salar de Huasco, Chilean Altiplano. Front. Microbiol. 9: 2228. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02228.
- Revilla I. and Ganzalez-san Jose M.L. 2003. Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. Int. J. Food Sci. Technol. 38:29–36.
- Rhoades J.D., Kandiah A. and Mashali A.M. 1992. The use of saline water for crop production. FAO irrigation and drainage paper 48. FAO, Rome.
- Ricca E., Calabrò V., Curcio S. and Iorio G. 2007. The State of the Art in the Production of Fructose from Inulin Enzymatic Hydrolysis. Critical Reviews in Biotechnology. 27(3): 129–145.doi:10.1080/07388550701503477.
- Richards L.A. 1954. Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali soils. U.S. Government Printing Office, Washington D.C. doi: 10.1126/science.120.3124.800.
- Roberfroid M.B., Van Loo J. and Gibson G.R. 1998. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. J. Nutrit. 128: 11-19.
- Robinson P.K. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays Biochem. 59: 1-41. doi: 10.1042/BSE0590001.
- Rocha J.R., Catana R., Ferreira B.S., Cabral J.M.S. and Fernandes P. 2006. Design and characterization of an enzyme system for inulin hydrolysis. Food Chemistry. 95: 77-82.
- Rodier J., Legube B. and Merlet N. 2009. Eaux naturelles, eau potable et réseaux, Analyse physico-chimique. In L'analyse de l'eau Contrôle et interprétation. 10rd edn. Dunod, Malakoff.
- Rodrigues D.F., Goris J., Vishnivetskaya T., Gilichinsky D., Thomashow M.F. and Tiedje J.M. 2006. Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of Exiguobacterium sibiricum sp. nov. Extremophiles. 10(4): 285- 294. https://doi.org/10.1007/s00792-005-0497-5.
- Rodriguez-Valera F. (ed). 1988. Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. In: Halophilic bacteria, vol 1. CRC Press, Boca Raton, ISBN 0-84934367-4, pp 3–30.
- Rohban R., Amoozegar M. and Ventosa A. 2009. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 36. doi : 333-40. 10.1007/s10295-008-0500-0.

- Romano I., Lama L., Nicolaus B., Poli A., Gambacorta A. and Giordano A. 2006. *Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *Incaldanensis* subsp. nov., an alkalitolerant halophile isolated from an algal mat collected from a sulfurous spring in Campania (Italy), and emended description of *Oceanobacillus oncorhynchi*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 805-810. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63575-0.
- Rosselló-Mora R.A., Caccavo F., Osterlehner K.Jr., Springer N., Spring S., Schuler D., Ludwig W., Amann R., Vancanneyt M. and Schleifer K.H. 1994a. Isolation and taxonomic characterization of a halotolerant, facultatively iron-reducing bacterium. Syst. App. Microbiol. 17: 569–573.
- Ruginescu R., Purcarea C., Dorador C., Lavin P., Cojoc R., Neagu S., Lucaci I. and Enache M. 2019. Exploring the hydrolytic potential of cultured halophilic bacteria isolated from the Atacama Desert. FEMS Microbiology Letters. 366(17). doi: 10.1093/femsle/fnz224.
- Sadiki A., Bouhlassa S., Auajjar J., Faleh A. and Macaire J.-J. 2004. Utilisation d'un SIG pour l'évaluation et la cartographie des risques d'érosion par l'Equation universelle des pertes en sol dans le Rif oriental (Maroc) : cas du bassin versant de l'oued Boussouab. Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Terre. n°26, p. 69-79.
- Safarpour A., Amoozegar M.A. and Ventosa A. 2018. Hypersaline Environments of Iran: Prokaryotic Biodiversity and Their Potentials in Microbial biotechnology. In: Egamberdieva D et al., (eds.) Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications, Microorganisms for Sustainability 8. Springer Nature Singapore Pte Ltd. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0329-6_9.
- Sakai T., Sakamoto T., Hallaert J. and Vandamme E.J. 1993. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. Adv. Appl. Microbiol. 39: 213-279.
- Sandhya Jayasekara and Renuka Ratnayake. 2019. Microbial Cellulases: An Overview and Applications. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.84531.
- Sanchez-Porro C., Martin S., Mellado E. and Ventosa A. 2003. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. Journal of Applied Microbiology. 94 : 295-300.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74(12): 5463–5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463.
- Sathiya G. 2013. Production of protease from *Bacillus Subtilis* and application in leather making process. Inter. J. Res. Biotechnol. Biochem. 3: 7-10.
- Satomi M., Fonnesbech vogel B., Gram L. and Venkateswaran K. 2006. *Shewanella hafniensis* sp. nov. and *Shewanella morhuae* sp. nov., isolated from marine fish of the Baltic Sea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 243-249. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63931-0.
- Satomi M., La Duc M.T. and Venkateswaran K. 2006. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 1735-1740. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64189-0.
- Satomi M., Fonnesbech Vogel B., Venkateswaran K. and Gram L. 2007. Description of *Shewanella glacialipiscicola* sp. nov. and *Shewanella algidipiscicola* sp. nov., isolated from marine fish of the Danish Baltic Sea, and proposal that *Shewanella affinis* is a later heterotypic synonym of *Shewanella colwelliana*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 347-352. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64708-0.
- Saxena R.K., Dutt K., Agarwal L. and Nayyar P. 2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. Bioresource Technol. 98: 260-265.
- Schallmey M., Singh A. and Ward O.P. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. Canadian J. Microbiol. 50 (1) : 1–17.
- Schumann W. 2007. Production of Recombinant Proteins in *Bacillus subtilis.* Advances in Applied Microbiology. 62: 137–189. doi :10.1016/s0065-2164(07)62006-1.
- See-Too W.-S., Chua K.-O., Lim Y.-L., Chen J.-W., Convey P., Mohidin T.B.M., Yin W.-F. and Chan K.-G. 2017. Complete genome sequence of *Planococcus donghaensis* JH1T, a pectin-degrading bacterium. Journal of Biotechnology. 252:11-14.
- Selim S., Hagagy N., Aziz M.A., El-Meleigy E.S. and Pessione E. 2014. Thermostable alkaline halophilic-protease production by *Natronolimnobius innermongolicus* WN18. Natural Product Research. 28:1476-1479. doi: 10.1080/14786419.2014.907288.
- Shajahan S., Ganesh Moorthy I., Sivakumar N. and Selvakumar G. 2017. Statistical modeling and optimization of cellulase production by *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 isolated from the hot spring, Maharashtra, India. Journal of King Saud University – Science. 29(3): 302-310. doi: 10.1016/j.jksus.2016.08.001.
- Shelford V.E. 1911. Physiological animal geography. J. Morphol. 22: 551-618. doi:10.1002/jmor.1050220303.
- Shi R., Yin M., Tang S.K., Lee J.C., Park D.J., Zhang Y.J., Kim C.J. and Li W.J. 2011. *Bacillus luteolus* sp nov., a halotolerant bacterium isolated from a salt field. International journal of systematic and evolutionary microbiology. doi:61. 1344-9. 10.1099/ijs.0.021683-0.
- Shivanand P., Mugeraya G. and Kumar A. 2013. Utilization of renewable agricultural residues for the production of extracellular halostable cellulase from newly isolated *Halomonas* sp. strain PS47. Ann. Microbiol. 63(4): 1257-1263. doi: 10.1007/s13213-012-0583-8.
- Siglioccolo A., Paiardini A., Piscitelli M. and Pascarella S. 2011. Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. BMC Struct. Biol. 11:50.
- Simidu U., Kita-Tsukamoto K., Yasumoto T. and Yotsu M. 1990. Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin. Int. J. Syst. Bacteriol. 40(4): 331–336.

- Singh R.S. and Singh R.P. 2017. Inulinases. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. 423–446. doi:10.1016/b978-0-444-63662-1.00018.
- Singh N.K., Raichand R., Kaur I., Kaur C., Pareek S. and Mayilraj S. 2013. *Exiguobacterium himgiriensis* sp. nov. a novel member of the genus *Exiguobacterium*, isolated from the Indian Himalayas. Antonie van Leeuwenhoek. 103: 789. https://doi.org/10.1007/s10482-012-9861-5.
- Sreena C.P. and Sebastian D. 2018. Augmented cellulase production by *Bacillus subtilis* strain MU S1 using different statistical experimental designs. Journal of Genetic Engineering and Biotechnolohy. 16(1): 9-16. doi: 10.1016/j.jgeb.2017.12.005.
- Sukumaran R.K., Singhania R.R. and Pandey A. 2005. Microbial cellulases – Production, applications and challenges. J. Sci. Ind. Res. 64: 832–844.
- Sumantha A., Larroche C. and Ashok P. 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. Food Technol. Biotechnol. 44: 211–220.
- Supré K., De Vliegher S., Cleenwerck I., Engelbeen K., Van Trappen S., Piepers S., Sampimon O.C., Zadoks R.N., De Vos P. and Haesebrouck F. 2010. *Staphylococcus devriesei* sp. nov., isolated from teat apices and milk of dairy cows. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 2739–2744. https://doi.org/10.1099/ijs.0.015982-0.
- Takashima S., Iikura H., Nakamura M., Hidaka M., Masaki H. and Uozumi T. 1998. Isolation of the gene and characterization of the enzymatic properties of a major exoglucanases of *Humicola grisea* without a cellulose-binding domain. J. Biochem. 124: 717- 725.
- Tamang J.P., Thapa S., Dewan S., Yasuka J., Fudou R. and Yamanaka S. 2002. Phylogenetic analysis of *Bacillus* strains isolated from fermented Soybean Foods of Asia: Kinema, Chungkokjang and Natto. Journal of Hill Research. 15(2): 56-62.
- Tejirian A. and Xu F. 2010. Inhibition of cellulase-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes. Appl. Environ. Microbiol. 76(23): 7673–7682. doi: 10.1128/AEM.01376-10.
- Teugjas H. and Väljamäe P. 2013. Product inhibition of cellulases studied with 14C-labeled cellulose substrates. Biotechnology for biofuels. 6:104. doi: 10.1186/1754-6834-6-104.
- Thérien Y. 2006. Du maïs pour l'éthanol. Le Bulletin des agriculteurs.
- Thomas L., Ram H., Kumar A. and Singh V.P. 2013. Industrial and biotechnological potential of microbial cellulases. Journal of Plant Development Sciences. 5(3): 237–247.
- Tiquia S.M., Davis D., Hadid H., Kasparian S., Ismail M., Sahly R., Shim J., Singh S. and Murray K.S. 2007. Halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow groundwater along the Rouge River of Southeastern Michigan. Environmental Technology. 28: 297-307.
- Tropeano M., Vazquez S., Coria S., Adrian T., Cicero D., Bercovich A., et al. 2013. Extracellular hydrolytic enzyme production by proteolytic bacteria from the Antarctic. Polish Polar Research. doi:10.2478/popore-2013-0014.
- Trujillo M.E. and Goodfellow M. 2015. Brevibacterium. In: Whitman W.B., Rainey F., Kämpfer P., Trujillo P., Chun J., DeVos P., Hedlund B. and Dedysh S. (eds) Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Chichester. doi: 10.1002/9781118960608.gbm00062.
- Turner S., Pryer K.M., Miao V.P. and Palmer J.D. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. J. Eukaryot. Microbiol. 46(4): 327-38.
- Ubeda J.F. and Briones A.I. 2007. Glucosidase activity in wine yeasts: application in enology. Enzyme Microb. Technol. 40:420–425.
- Vaisman N. and Oren A. 2009. *Salisaeta longa* gen. nov., sp. nov., a red, halophilic member of the Bacteroidetes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59(Pt 10): 2571-4.
- Ventosa A., Márquez M.C., Ruiz-Berraquero F. and Kocur M. 1990. *Salinicoccus roseus* gen. nov., sp. nov., a New Moderately Halophilic Gram-Positive Coccus. Systematic and Applied Microbiology. 13(1): 29–33. doi:10.1016/s0723-2020(11)80177-3.
- Ventosa A., Nieto J.J. and Oren A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(2): 504-44.
- Ventosa A. and Arahal D.R. 2009. Halophily (Halophilism and Halophilic Microorganisms. In: Gerday C. and Glansdorff N. (eds) Extremophiles. EOLSS, Oxford, United Kingdom.
- Ventosa A., de la Haba R.R., Sánchez-Porro C. and Papke R.T. 2015. Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. Curr. Opin. Microbiol. 25: 80-87. https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.002.
- Vera-Gargallo B. and Ventosa A. 2018. Metagenomic Insights into the Phylogenetic and Metabolic Diversity of the Prokaryotic Community Dwelling in Hypersaline Soils from the Odiel Saltmarshes (SW Spain). Genes. 9(3): 152 doi: 10.3390/genes9030152.
- Verachtert H. and De Mot R. 1990. Yeast: biotechnology and biocatalysis, Marcel Decker. Inc. New York, pp. 257-296.
- Vernozy-Rozand C., Mazuy C., Meugnier H., Bes M., Lasne Y., Fiedler F., Etienne J. and Freney J. 2000. *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. Int. J. Syst. Evo. Microbiol. 50, 1521–1527.
- Vijayaraghavan K., Yamini D., Ambika V. and Sravya Sowdamini N. 2009. Trends in inulinase production – a review. Critical reviews in biotechnology. 29: 67-77. doi:10.1080/07388550802685389.
- Vijay A., Arora S., Gupta S. and Chhabra M. 2018. Halophilic starch degrading bacteria isolated from Sambhar Lake, India, as potential anode catalyst in microbial fuel cell: A promising process for saline water treatment. Bioresource Technology. 256: 391-398.

- Vogel B.F., Jorgensen K., Christensen H., Olsen J.E. and Gram L. 1997. Differentiation of *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella alga* on the basis of whole-cell protein profiles, ribotyping, phenotypic characterization, and 16S rRNA gene sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2189–2199.
- Vreeland R.H., Litchfield C.D., Martin E.L. and Elliot E. 1980. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salttolerant bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 30, 485–495.
- Waghmode S., Suryavanshi M., Dama L., Kansara S., Ghattargi V., Das P., Banpurkar A. and Satpute S.K. 2019. Genomic Insights of Halophilic *Planococcus maritimus* SAMP MCC 3013 and Detail Investigation of Its Biosurfactant Production. Front. Microbiol. 10:235. doi: 10.3389/fmicb.2019.00235.
- Wang C.-Y., Ng C.-C., Tzeng W.-S. and Shyu Y.-T. 2009. *Marinobacter szutsaonensis* sp. Nov., isolated from a solar saltern. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 2605–2609.
- Wang L., Liu W.-Y., Gu Z.-J., Chen S.-F. and Yang S.-S. 2010. *Oceanobacillus manasiensis* sp. Nov., a moderately halophilic bacterium isolated from the salt Lakes of Xinjiang, China. J. Microbiol. 48(3):312-317. https://doi.org/10.1007/s12275-010-0135-5.
- Webster J.A., Bannerman T.L., Hubner R.J., Ballard B.N., Cole E.M., Bruce J.L., Fiedler F., Schubert K. and Kloos W.E. 1994. Identification of the *Staphylococcus sciuri* Species Group with EcoRI Fragments Containing rRNA Sequences and Description of *Staphylococcus vitulus* sp. nov. Int. J. Syst. Bact. 44(3): 454-460.
- Wei S., Liu B., Cui H., Fan R., Guo C. and Sun M. 2018. Diversity of culturable moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes from marine sediments. Bioscience Journal. Uberlândia, 34(6): 1724-1732.
- Werber M.M. and Mevarech M. 1978. Purification and characterization of a highly acidic 2Fe-ferredoxin from *Halobacterium* of the Dead Sea. Archives of Biochemistry and Biophysics. 187(2): 447-456. doi :10.1016/0003-9861(78)90056-5.
- Whitman W., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M., Ludwing W., Suzuki K.-I. and Parte A. 2012. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer, New York, N.Y., USA. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4.
- Willey J.M., Sherwood L., Woolverton C.J. and Prescott L.M. 2008. Prescott, Harley, and Klein's microbiology. New York: McGraw-Hill Higher Education.
- Wirick M.G. 1968. A study of the enzymic degradation of CMC and other cellulose ethers. Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry. 6(7): 1965–1974.doi:10.1002/pol.1968.150060718.
- Wu S., Liu G., Zhang D., Li C. and Sun C. 2015. Purification and biochemical characterization of an alkaline protease from marine bacteria *Pseudoalteromonas* sp. 129-1. Journal of Basic Microbiology. 55(12): 1427–1434.doi:10.1002/jobm.201500327.
- Xu B., Hellman U., Ersson B. and Janson J.C. 2000. Purification, characterization and aminoacid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo-β-1,4-glucanase from Blue Mussel, Mytilus edulis. Euro. J. Biochem. 267: 4970-4977.
- Xu B. 2002. Endoglucanase and Mannanase from Blue Mussel, Mytilus edulis: Purification, Characterization, Gene and Three Dimensional Structure. Thése de doctorat. Faculty of Science and Technology, Uppsala University, Sweden.
- Xu M., Guo J., Cen Y., Zhong X., Cao W. and Sun W. 2005. *Shewanella decolorationis* sp. nov., a dyedecolorizing bacterium isolated from activated sludge of a waste-water treatment plant. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 363–368. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63157-0
- Yaakop A.S., Chan K.G., Ee R., Kahar U.M., Kon W.C. and Goh K.M. 2015. Isolation of *Jeotgalibacillus malaysiensis* sp. nov. from a sandy beach, and emended description of the genus *Jeotgalibacillus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 65, 2215–2221.doi : 10.1099/ijs.0.000242.
- Yoon J.H., Lee K.C., Weiss N., Kang K.H. and Park Y.H. 2003. *Jeotgalicoccus halotolerans* gen. nov., sp. nov. and *Jeotgalicoccus psychrophilus* sp. nov., isolated from the traditional Korean fermented seafood jeotgal. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53(2) : 595–602.doi : 10.1099/ijs.0.02132-0.
- Yoon J.-H., Kim B.-C. and Park Y.-H. 2015. *Planomicrobium*. In: Whitman W.B., Rainey F., Kämpfer P., Trujillo M., Chun J., DeVos P., Hedlund B. and Dedysh S. (eds) Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Chichester. pp 1–6. doi:10.1002/9781118960608.gbm00562.
- Yousefi-Mokri M., Sharafi A., Rezael S., Sadeghian-Abadi S., Imanparast S., Moghrabi-Manzari M., Amanzadeh Y. and Faramarzi M.A. 2019. Enzymatic hydrolysis of inulin by an immobilized extremophilic inulinase from the halophile bacterium *Alkalibacillus filiformis*. Carbohydrate Research. https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107746.
- Yu H.-Y. and Li X. 2015 Alkali-stable cellulase from a halophilic isolate, *Gracilibacillus* sp. SK1 and its application in lignocellulosic saccharification for ethanol production. Biomass and Bioenergy. 81: 19-25.
- Zhai R., Hu J. and Saddler J.N. 2018. The inhibition of hemicellulosic sugars on cellulose hydrolysis are highlydependant on the cellulase productive binding, processivity, and substratesurface charges. Bioresource Technology. 258:79-87. doi: 10.1016/j.biortech.2017.12.006.
- Zhang D.-C., Liu H.-C., Xin Y.-H., Yu Y., Zhou P.-J. and Zhou Y.G. 2009. *Planomicrobium glaciei* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from a glacier. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 1387–1390. https://doi.org/10.1099/ijs.0.002592-0.
- Zhao K., Guo L.Z. and Lu W.D. 2012. Extracellular production of novel halotolerant, thermostable, and alkali-stable carboxymethyl cellulase by marine bacterium *Marinimicrobium* sp. LS-A18. Applied Biochemistry and Biotechnology. 168(3): 550–567. doi:10.1007/s12010-012-9796-3.

- Zhilina T.N., Zavarzin G.A., Rainey F., Kevbrin V.V., Kostrikina N.A. and 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. Bacteriol. 46: 305–312.
- Zhu D., Hosoi-Tanabe S., Xie C., Honda D., Sun J. and Ai L. 2014. *Bacillus ligniniphilus* sp. nov., an alkaliphilic and halotolerant bacterium isolated from sediments of South China Sea.. International journal of systematic and evolutionary microbiology. doi: 64. 10.1099/ijs.0.058610-0.
- Zhu T., Li R., Sun J., Cui Y. and Wu B. 2020. Characterization and efficient production of a thermostable, halostable and organic solvent-stable cellulase from an oil reservoir. International Journal of Biological Macromolecules. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.02.

ANNEXES

Annexe 1

Tableau A1.1. Caractéristiques morphologiques des isolats de la collection. Avec les codes suivants : couleur, translucide ou transparent = 0, blanc = 1, beige = 2, rose pâle = 3, jaune pâle = 4, orange pâle = 5 et orange = 6. Les codes de la forme de la colonie : concave et régulière = 0, concave et irrégulière = 1, convexe et régulière = 2, convexe et irrégulière = 3, plate et régulière = 4 et plate et irrégulière = 5.

Code isolat	Couleur	Colonie	Gram	Forme
4SS1	5	0	+	Bacille
6MS1	0	0	+	Bacille
7MS1	1	0	+	Bacille
10MS1	4	0	+	Cocci
13SS1	0	2	+	Cocci
14SS1	4	0	+	Bacille
15SSS1	1	0	+	Bacille
16SS1	3	0	+	Bacille
17SS1	1	0	+	Bacille
18SS1	2	0	+	Cocci
19SS1	2	1	+	Cocci
20SS1	0	0	-	Bacille
21MS1	0	1	+	Bacille
24SS1	2	2	+	Bacille
25MS1	6	2	+	Cocci
26SSS1	1	4	+	Bacille
27SSS1	2	5	+	Bacille
28SSS1	0	1	+	Bacille
29SSS1	0	3	+	Cocci
30SS1	0	4	+	Bacille
31SS1	3	4	+	Bacille
32SS1	4	0	-	Cocci
35SS1	1	3	+	Bacille
36SS1	4	0	+	Bacille
37SS1	4	5	+	Cocci
400SS1	1	4	+	Bacille
41SS1	1	2	+	Bacille
42WMS1	3	5	+	Bacille
43SS1	1	4	+	Bacille
44SS1	6	4	+	Bacille
45SS1	0	0	+	Bacille
46SS1	4	0	+	Bacille
47SS1	3	0	+	Bacille
48SS1	2	2	+	Bacille

49SS1	2	0	-	Bacille
51WMS1	2	4	-	Cocci
52WMS1	2	0	+	Bacille
53WMS1	2	0	-	Cocci
55SSS1	0	0	+	Bacille
56WMS1	6	4	-	Cocci
57WMS1	2	0	+	Bacille
58WMS1	1	0	+	Bacille
59SS1	2	1	-	Cocci
60SS1	0	0	-	Bacille
63SS1	0	0	-	Cocci
64SS1	1	0	+	Cocci
65SS1	4	0	+	Bacille
66SS1	0	1	+	Bacille
67SS1	2	5	-	Bacille
68WMS1	1	4	+	Bacille
681MS1	2	1	+	Bacille
682MS1	6	4	+	Bacille
69SS1	2	0	+	Bacille
70SS1	3	0	+	Bacille
71SS1	2	0	-	Bacille
72SS1	2	4	-	Cocci
73SS1	2	0	-	Cocci
74SS1	4	0	+	Bacille
77SS1	1	1	+	Cocci
771SS1	4	4	+	Bacille
772SS1	6	4	+	Bacille
78MS1	0	0	+	Bacille
79MS1	4	0	-	Cocci
80SS1	1	0	+	Bacille
810SS1	0	0	+	Bacille
82SS1	2	0	+	Bacille
83SS1	2	4	-	Cocci
84SS1	5	0	-	Bacille
85SS1	0	0	-	Bacille
87MS1	2	0	+	Bacille
881MS1	6	4	+	Bacille
94SS1	2	1	+	Bacille
95SS1	1	1	-	Bacille
96SS1	3	0	-	Bacille
97SS1	3	5	-	Bacille
981WMS1	2	1	+	Bacille
982WMS1	2	0	+	Bacille

100MS1	2	0	+	Bacille
102SS1	0	4	+	Cocci
103SS1	2	5	+	Cocci
1031MS1	0	0	+	Cocci
1032MS1	6	0	+	Bacille
105MS1	0	0	+	Bacille
107MS1	0	0	-	Bacille
108MS1	0	0	+	Bacille
109MS1	1	0	+	Bacille
1091SS1	1	0	+	Cocci
10901SS1	0	1	+	Bacille
1092SS1	4	5	+	Bacille
10902SS1	4	0	+	Bacille
111MS1	0	0	-	Bacille
112MS1	6	5	-	Bacille
122MS1	1	1	+	Bacille
123MS1	0	0	+	Bacille
125MS1	2	0	-	Cocci
126MS1	1	1	+	Cocci
127SSS1	0	0	-	Bacille
128SSS1	0	1	-	Bacille
129SSS1	0	0	-	Bacille
130SSS1	6	0	-	Cocci
131SSS1	2	0	-	Bacille
132SSS1	0	0	-	Cocci
133SSS1	0	0	-	Cocci
135MS1	3	0	-	Bacille
139MS1	0	1	-	Bacille
140SS1	6	0	-	Cocci
141SS1	6	0	+	Bacille
142MS1	1	0	+	Bacille
143MS1	2	0	-	Bacille
144MS1	4	0	-	Bacille
149SS1	1	4	-	Cocci
150SS1	2	0	-	Cocci
152SS1	2	0	-	Bacille
153SS1	0	0	+	Cocci
154SS1	0	1	-	Bacille
155SS1	1	0	-	Cocci
156MS1	1	0	-	Bacille
157MS1	4	0	-	Bacille
159MS1	2	0	-	Bacille
160MS1	3	0	-	Cocci

161MS1	1	0	-	Cocci
168MS1	0	1	+	Bacille
169MS1	0	1	+	Bacille
170MS1	1	1	-	Cocci
171MS1	1	1	-	Cocci
172MS1	3	1	+	Cocci
175MS1	0	1	+	Bacille
176MS1	0	1	+	Bacille
177MS1	4	1	-	Bacille
180MS1	0	1	-	Cocci
182MS1	1	1	-	Bacille
184MS1	2	1	+	Bacille
195MS1	1	1	+	Bacille
196MS1	1	1	-	Cocci
198MS1	1	0	+	Bacille
199MS1	2	1	+	Cocci
201MS1	4	5	+	Bacille
208MS1	4	0	-	Bacille
209MS1	0	0	-	Bacille
228SS1	5	5	-	Bacille
229MS1	1	5	-	Cocci
230WMS1	1	5	-	Cocci
231WMS1	0	0	-	Cocci
33WMS2	4	1	+	Bacille
34WMS2	1	1	+	Bacille
38WMS2	4	1	+	Bacille
39WMS2	1	3	+	Bacille
40MS1	6	4	+	Bacille
402MS2	0	4	+	Bacille
61WMS2	1	0	-	Cocci
62SS2	1	1	+	Cocci
86WMS2	0	5	+	Bacille
88WMS2	1	0	+	Bacille
882MS2	2	0	+	Bacille
89MS2	0	0	-	Cocci
90MS2	2	0	+	Bacille
91MS2	1	0	-	Bacille
92MS2	6	2	-	Bacille
93MS2	2	0	-	Cocci
99SS2	1	1	+	Bacille
990SS2	5	0	+	Bacille
101SS2	2	5	+	Bacille
1011WMS2	4	0	+	Bacille

1012MS2	1	0	+	Bacille
104SS2	2	0	+	Bacille
1040SS2	1	0	+	Bacille
110SS2	0	5	+	Bacille
114SS2	6	4	-	Bacille
115SS2	0	0	-	Cocci
116SS2	2	0	+	Cocci
117MS2	0	4	+	Bacille
162WMS2	2	4	-	Bacille
165WMS2	2	1	-	Bacille
166WMS2	2	1	+	Bacille
167WMS2	2	1	-	Bacille
187SS2	0	1	+	Bacille
189SS2	2	5	-	Cocci
190SS2	2	1	-	Bacille
191SS2	3	3	+	Bacille
203WMS2	1	4	-	Cocci
207WMS2	0	2	-	Cocci
401SS3	6	4	+	Cocci
54WMS3	3	2	-	Cocci
1020SS3	1	4	+	Bacille
113MS3	0	0	+	Bacille
134WMS3	2	4	-	Bacille
158WMS3	1	1	+	Bacille
185WMS3	0	1	-	Cocci
197WMS3	1	1	+	Bacille

Tableau A1.2. Antibiogramme des souches de la collection, avec : R= Résistante ET S= Sensible, Amp : Ampicilline ; Kan : Kanamycine ; AMC-Cla : Amoxicilline-Acide clavulanique ; CIP : Ciprofloxacine ; Cm : Chloramphenicol ; STP : Streptomycine Flu : Flucoxalline.

Code isolat	Amp (10µg/ml)	Kan (30µg/ml)	AMC-Cla (20-10µg/ml)	CIP (5µg/ml)	Cm (30µg/ml)	STP (30 µg/ml)	Flu (30 µg/ml)
4SS1	R	S	R	S	S	R	S
6MS1	S	R	S	S	R	S	S
7MS1	S	S	S	S	S	S	S
10MS1	R	S	S	S	S	R	S
13SS1	R	R	S	S	S	S	S
14SS1	S	S	S	S	R	S	S
15SSS1	R	S	S	R	S	S	S
16SS1	S	S	R	S	R	S	S
17SS1	S	S	S	S	S	S	S
18SS1	S	S	S	R	S	S	S
19SS1	S	R	R	S	S	R	S
20SS1	R	S	S	R	S	S	S
21MS1	S	S	S	S	S	S	R
24SS1	S	S	S	S	S	S	S
25MS1	S	S	R	S	S	S	S
26SSS1	S	S	S	S	S	S	S
27SSS1	S	S	R	S	S	R	S
28SSS1	S	S	R	S	S	S	S
29SSS1	S	S	S	S	S	S	R
30SS1	S	S	R	S	S	S	S
31SS1	S	S	S	S	S	S	S
32SS1	R	S	S	S	R	S	R
35SS1	S	S	S	R	S	S	S
36SS1	S	S	S	S	S	R	R
37SS1	R	R	S	S	S	S	R
400SS1	S	S	R	R	S	S	S
41SS1	S	S	S	S	S	S	R
42WMS1	R	S	S	S	S	S	R
43SS1	S	S	S	S	S	S	S
44SS1	S	S	S	R	S	S	S
45SS1	R	S	S	R	S	S	S
46SS1	S	S	S	S	S	S	R
47SS1	S	S	S	S	S	S	S
48SS1	R	R	S	R	S	S	S
49SS1	R	R	S	S	S	S	S
51WMS1	R	S	S	S	S	S	R
52WMS1	S	S	S	S	S	S	R

53WMS1	R	S	S	S	S	R	R
55SSS1	S	S	S	S	R	S	R
56WMS1	S	S	S	S	S	S	R
57WMS1	S	S	S	S	S	S	R
58WMS1	S	S	S	S	S	S	R
59SS1	R	S	S	S	S	S	S
60SS1	R	S	S	S	S	S	R
63SS1	R	S	S	S	S	S	S
64SS1	S	R	S	S	S	S	S
65SS1	R	S	S	S	S	S	R
66SS1	S	S	S	S	S	S	R
67SS1	R	S	S	S	S	S	R
68WMS1	S	S	S	S	S	S	R
681MS1	S	S	S	S	R	R	R
682MS1	R	S	S	S	S	S	S
69SS1	S	S	S	S	S	R	R
70SS1	R	S	S	S	S	S	R
71SS1	R	S	S	S	S	S	R
72SS1	R	S	S	S	R	S	R
73SS1	R	S	S	S	S	S	R
74SS1	S	S	S	S	S	S	S
77SS1	S	S	R	S	S	S	S
771SS1	R	S	S	S	S	S	S
772SS1	R	S	S	R	R	S	S
78MS1	S	S	S	S	R	S	S
79MS1	R	S	S	R	S	S	S
80SS1	S	R	S	S	S	R	S
810SS1	S	R	S	R	S	S	S
82SS1	S	S	S	S	S	S	R
83SS1	S	R	S	R	S	S	R
84SS1	R	S	S	R	S	S	S
85SS1	R	S	S	S	S	S	R
87MS1	S	S	S	S	S	S	S
881MS1	S	S	S	S	S	S	S
94SS1	S	S	S	R	S	S	S
95SS1	R	R	S	R	S	S	R
96SS1	R	S	S	R	S	S	S
97SS1	R	S	S	S	S	S	R
981WMS1	S	S	S	S	S	S	R
982WMS1	R	R	S	R	S	S	S
100MS1	S	S	S	R	R	S	R
102SS1	S	S	S	S	S	S	R
103SS1	S	S	S	S	S	S	S
1031MS1	R	S	S	R	S	S	S
1032MS1	R	S	S	S	S	S	S

105MS1	S	S	S	S	S	S	S
107MS1	S	R	R	R	S	S	S
108MS1	S	S	S	R	S	S	S
109MS1	S	S	S	S	S	S	R
1091SS1	R	S	S	R	S	S	R
10901SS1	S	R	R	R	S	S	R
1092SS1	S	S	R	S	S	S	R
10902SS1	S	R	S	S	S	S	S
111MS1	R	S	R	S	S	S	S
112MS1	R	S	R	R	S	S	S
122MS1	S	S	S	R	S	S	S
123MS1	R	S	S	S	S	S	S
125MS1	R	S	R	S	S	S	S
126MS1	R	S	S	R	S	S	S
127SSS1	S	S	S	R	S	R	S
128SSS1	R	S	S	S	S	S	R
129SSS1	S	S	S	R	S	S	S
130SSS1	S	S	S	R	S	S	R
131SSS1	R	S	S	R	S	R	R
132SSS1	R	S	S	R	S	S	R
133SSS1	S	S	S	R	R	S	S
135MS1	S	S	S	S	R	S	R
139MS1	R	S	S	S	S	S	S
140SS1	R	S	S	R	S	S	R
141SS1	S	S	S	S	S	S	R
142MS1	S	S	S	S	S	S	R
143MS1	S	S	S	R	S	S	R
144MS1	S	S	S	R	S	S	S
149SS1	S	S	S	S	S	R	R
150SS1	R	S	S	S	S	S	R
152SS1	R	S	S	R	S	S	R
153SS1	S	S	S	S	S	S	R
154SS1	S	S	S	R	S	S	S
155SS1	S	S	S	R	R	R	S
156MS1	R	S	R	S	S	S	S
157MS1	R	S	R	S	S	S	S
159MS1	S	S	S	S	S	S	R
160MS1	S	S	S	S	S	S	R
161MS1	S	S	S	R	S	S	R
168MS1	S	S	S	S	S	S	S
169MS1	R	S	R	S	S	S	S
170MS1	R	S	S	S	S	S	S
171MS1	S	S	S	S	S	S	R
172MS1	S	S	R	R	S	S	R
175MS1	S	S	S	S	S	R	S

176MS1	S	S	S	S	S	S	R
177MS1	S	R	R	S	S	R	S
180MS1	R	S	S	R	S	R	R
182MS1	S	S	S	S	S	S	R
184MS1	S	S	R	R	S	S	R
195MS1	S	S	S	S	S	S	S
196MS1	R	S	R	S	S	S	R
198MS1	S	S	S	S	S	R	S
199MS1	S	S	S	R	S	S	S
201MS1	R	S	S	S	S	S	S
208MS1	R	S	R	S	S	R	S
209MS1	R	S	R	R	R	S	S
228SS1	S	S	S	S	R	S	S
229MS1	S	S	S	S	S	S	S
230WMS1	R	S	R	R	S	S	S
231WMS1	R	S	R	R	S	S	S
33WMS2	S	S	S	S	R	R	S
34WMS2	S	S	S	S	S	S	R
38WMS2	S	S	S	R	S	S	R
39WMS2	R	S	S	S	S	R	R
40MS1	R	S	S	S	R	S	S
402MS2	S	S	S	S	S	S	R
61WMS2	R	S	R	S	S	S	R
62SS2	R	S	R	S	R	S	S
86WMS2	S	S	S	S	S	S	S
88WMS2	S	S	S	S	S	S	S
882MS2	S	S	S	S	S	S	S
89MS2	R	S	S	S	S	S	R
90MS2	S	S	R	R	S	R	R
91MS2	S	S	S	S	S	S	S
92MS2	S	S	S	S	S	S	R
93MS2	S	S	S	R	S	S	R
99SS2	S	S	S	S	S	S	S
990SS2	S	S	S	R	S	S	R
101SS2	S	S	S	S	S	S	R
1011WMS2	S	S	S	S	S	S	S
1012MS2	S	S	S	S	R	S	S
104SS2	R	S	S	R	R	S	R
1040SS2	R	S	S	S	S	S	S
110SS2	S	S	S	S	S	S	S
114SS2	S	R	S	S	S	S	R
115SS2	R	S	S	S	S	S	R
116SS2	S	S	S	S	S	S	R
117MS2	S	S	S	S	S	S	S
162WMS2	S	S	S	S	S	S	S

165WMS2	S	S	S	S	S	S	S
166WMS2	S	S	S	S	S	S	S
167WMS2	S	S	S	S	S	S	R
187SS2	R	S	R	S	S	S	S
189SS2	R	S	R	R	S	S	R
190SS2	S	S	S	S	S	S	S
191SS2	R	S	R	S	S	S	R
203WMS2	S	R	S	S	R	S	R
207WMS2	R	S	S	R	R	S	R
401SS3	S	S	S	S	S	S	R
54WMS3	R	S	S	S	S	S	S
1020SS3	S	S	S	S	S	S	S
113MS3	R	R	S	S	S	R	S
134WMS3	S	S	S	S	R	S	S
158WMS3	R	S	R	S	S	S	S
185WMS3	R	R	S	S	R	S	S
197WMS3	S	S	S	S	S	S	S

Tableau A1.3. Liste des souches utilisées comme références et leurs numéros d'accès à leurs séquences ARNr 16S dans la base de données GenBank, ainsi que la concentration en sel qui permet leurs croissances. ND : Non Déterminé.

Closest neighbors type strains	**Accession number**	**NaCl (g/L)**	**References**
Bacillus atrophaeus strain NBRC 15539	MH283882.1	0-70	Nakamura 1989
Bacillus australimaris strain MCCC 1A05787	JX680098.1	0-120	Liu et al. 2016
Bacillus halotolerans strain DSM 8802	NR_115063.1	0-25	Ben-Gad and Gerchman 2017
Bacillus haynesii strain NRRL B-41327	NR_157609.1	0-120	Dunlap et al. 2017
Bacillus safensis strain NBRC 100820	KY174336.1	0-100	Satomi et al. 2006
Bacillus subtilis strain JCM 1465	MH145363.1	0-70	Tamang et al. 2002
Bacillus tequilensis strain 10b	HQ223107.1	ND	Gaston et al. 2006
Bacillus zhangzhouensis strain MCCC 1A08372	JX680133.1	0-120	Liu et al. 2016
Exiguobacterium aestuanii strain TF 16	AY594264.1	0-170	Kim et al. 2005
Exiguobacterium himgiriensis strain K22-26	JX999056.1	0-100	Singh et al. 2013
Exiguobacterium marinum strain TF-80	AY594266.1	0-150	Kim et al. 2005
Exiguobacterium profodum strain 10C	AY818050.1	0-110	Crapart et al. 2007
Exiguobacterium sibiricum strain 255-15	DQ019147.1	0-100	Rodrigues et al. 2006
Oceanobacillus halophilus strain J8B	HQ433454.1	3-150	Amoozegar et al. 2016
Oceanobacillus kapialis strain SSK2-2	AB366005.1	5-240	Namwong et al. 2009
Oceanobacillus manasiensis strain YD3-56	FJ386518.1	25-15	Wang et al. 2010
Oceanobacillus oncorhynchi subsp *incaldanensis* strain 20AG	AJ640134.1	50-200	Romano et al. 2006
Ornithinibacillus salinisoli strain LCB256	KX008966.2	30-170	Gen et al. 2018
Planomicrobium alkanoclastium strain MAE2	NR_024864.1	8-33	Engelhardt et al. 2001
Planomicrobium chinense strain DX3-12	AJ697862.1	0-100	Dai et al. 2005
Planomicrobium flavidum strain ISL-41	FJ265708.1	10-130	Jung et al. 2009
Planomicrobium glaciei strain 0423	EU036220.1	0-110	Zhang et al. 2009
Planomicrobium stackebrandtii strain K22-03	NR_025781.1	0-80	Mayilraj et al. 2005
Sanguibacter inulinus strain ST50	AB920571.1	ND	Pasual et al. 1996
Sanguibacter keddieii strain DMS 10542	NR_074716.2	0-75	Ivanova et al. 2009
Sanguibacter marinus strain DMS 1-19	AJ783958.1	0-70	Huang et al. 2005
Shewanella decolorationis strain NBRC 103170	AB681977.1	ND	Xu et al. 2005
Shewanella glacialipiscicola strain NBRC 102030	AB681674.1	0-60	Satomi et al. 2007
Shewanella hafniensis strain NBRC 100975	AB681311.1	0-60	Satomi et al. 2006
Shewanella morhuae strain NBRC 100978	AB681314.1	0-40	Satomi et al. 2006
Shewanella putrefaciens strain ATCC 8071	FJ971881.1	0-40	Satomi et al. 2007
Shewanella xiamenensis strain S4	FJ589040.1	0-60	Huang et al. 2010
Staphylococcus cohnii strain GH 137	NR_036902.1	0-100	Kloos and Schleifer 1975
Staphylococcus devriesei strain KS-SP 60	FJ389206.1	ND	Supré et al. 2010
Staphylococcus equorum strain PA 231	NR_027520.1	0-150	Jeong et al. 2013
Staphylococcus fleurettii strain GTC 1999	AB233330.1	0-100	Vernozy-Rozand et al. 2000
Staphylococcus sciuri strain DSM 20345	NR_025520.1	0-150	Kloos et al. 1976
Staphylococcus stepanovicii strain 196	GQ222244.1	ND	Hauschild et al. 2010
Staphylococcus vitulinus strain ATCC 51145(2)	DQ120752.1	ND	Webster et al. 1994

Annexe 2

Composition de :

Milieu M9 (milieu minimum) :

Na_2HPO_4, $12H_2O$	6 g/L
KH_2PO_4	3 g/L
NaCl	1 g/L (à modifier selon la concentration désirée)
NH_4Cl	1 g/L

Après autoclavage à 110°C – 15min, ajouter :

$CaCl_2$, $2H_2O$, (0.1 mol/L)	1 mL
$MgSO_4$, $7H_2O$ (1.0 mol/L)	1 mL

Solution de Lugol : pour 100mL

I_2	0.3 % (p/v)
KI	3 % (p/v)

Réactif DNS :

Potassium Sodium tartrate tetrahydrate	300 g/L
NaOH	16 g/L
DNS	10 g/L

Réactif de Bradford :

G250 Coomasie Blue	100 mg
Acide Phosphorique	100 mL
Ethanol 89%	50 mL
NaOH 1.0 M	50 mL
Complèter à 1000 mL	

Solution de caséine

Caséine	0.6% (p/v)
Tampon NaOH-Borax 20 mM, pH 10	100 mL

NaOH-Borax Buffer :

Solution stock A: 0,2M Glycine (15.01 g/L)

B: 0,2 M NaOH (8.01 g/L)

50 mL de solution A + x mL de Solution B est compléter à 200 mL d'E.D

x en mL	pH	x en mL	pH	x en mL	pH
4,0	8.6	12,0	9.2	27,2	9.8
6,0	8.8	16,8	9.4	32,0	10.0
8,8	9.0	22,4	9.6	38,6	10.4

Mélange TCA:

Acide Trichloro acétique (0.11 mol/L)	18 g/L
Sodium acetate (0.22 mol/L)	29,9 g/L
Acide Acétique (0.33 mol/L)	330 mL

Gammes d'étalonnage:

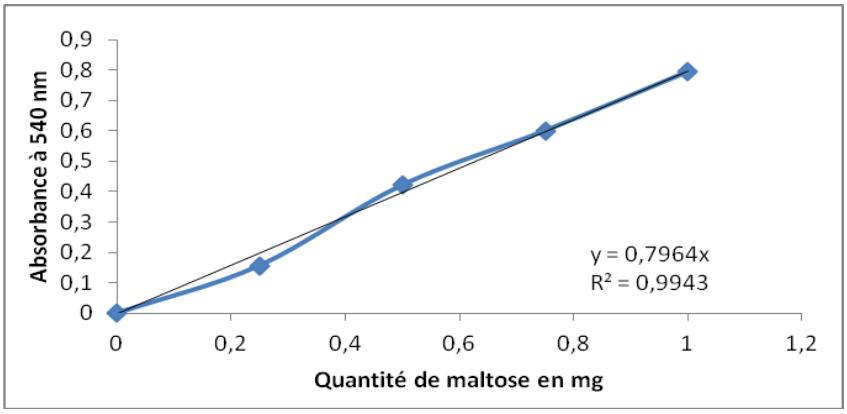


Figure A2.1. Courbe d'étalonnage du maltose

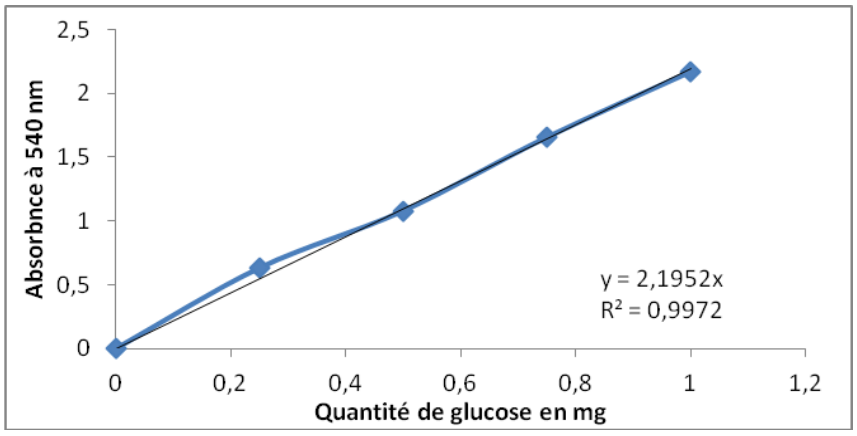


Figure A2.2. Courbe d'étalonnage du glucose

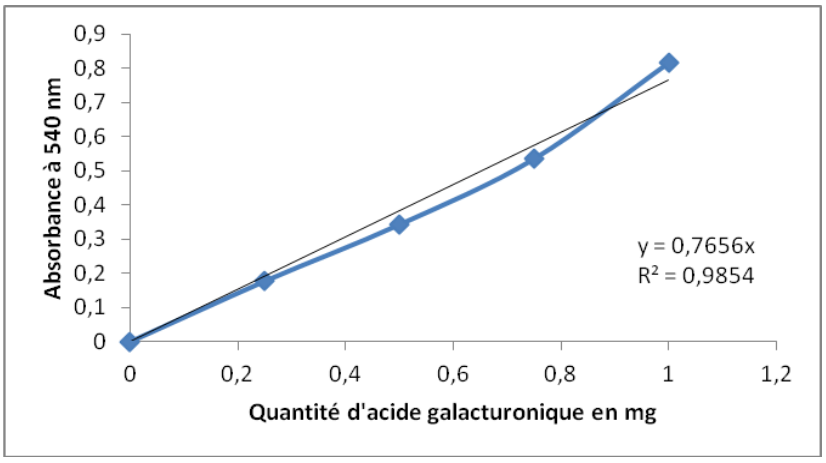


Figure A2.3. Courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique

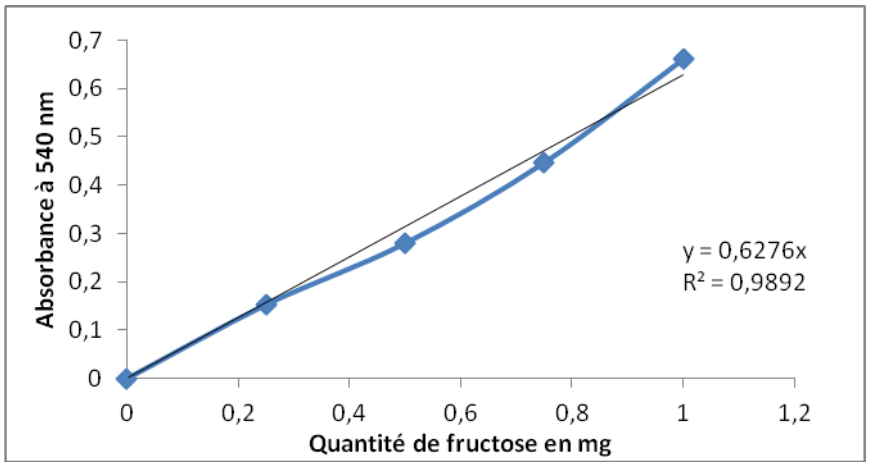


Figure A2.4. Courbe d'étalonnage du fructose

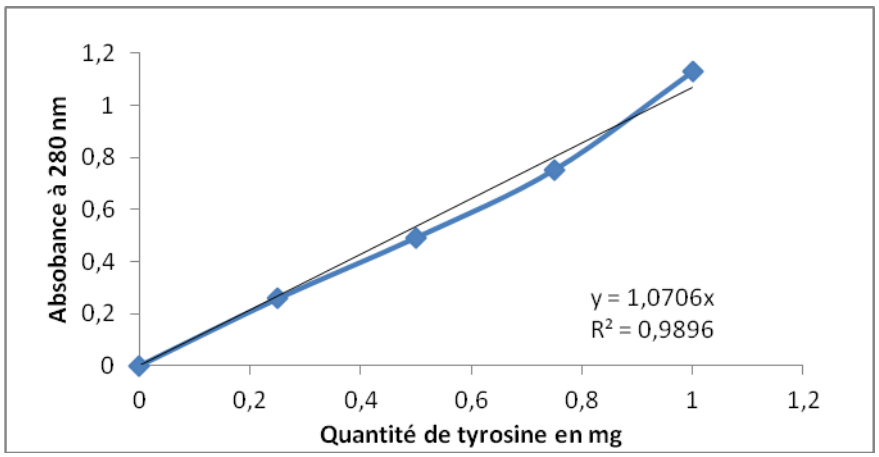


Figure A2.5. Courbe d'étalonnage de la tyrosine

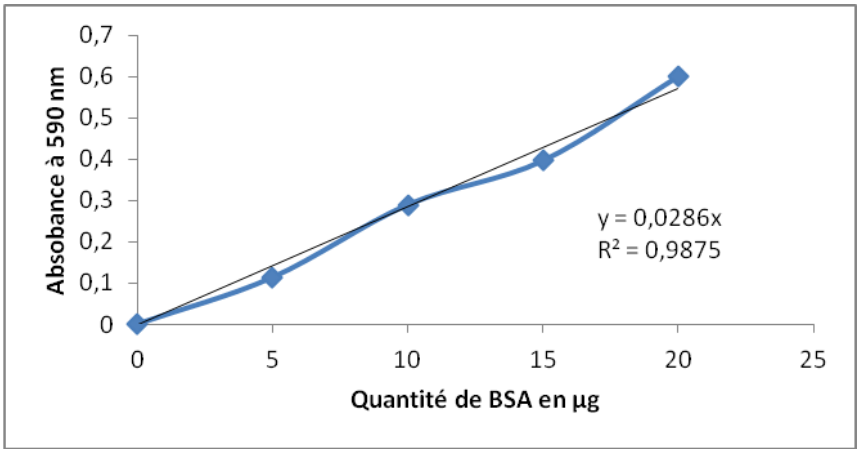


Figure A2.6. Courbe d'étalonnage du BSA

Tableau A2.1. Identification biochimique, physiologique et moléculaire des 189 souches dotées d'activité enzymatique (A.E.) de la collection. L'activité enzymatique (U/mg), la croissance (DO 600 nm), Numéro d'accession et catégorie d'halophilisme.

Nom de la souche (code)	16S rDNA Numéro d'accession	Marge de NaCl pour la croissance (g/L)	Catégorie d'halophilisme	Cellulase (U/mg)	Amylase (U/mg)	Protéase (U/mg)	Pectinase (U/mg)	Inulinase (U/mg)	[NaCl] de l'A.E. déterminé
				Croissance (DO 600 nm)	Croissance (DO 600 nm)	Croissance (DO 600 nm)	Croissance (DO 600 nm)	Croissance (DO 600 nm)	
Bacillus endophyticus (4SS1)	-	60-120	Faiblement	0.38 ± 0.11	0.00	0.00	0.00	43.26 ± 4.41	0.2 M
				0.316 ± 0.08	0.00	0.00	0.00	0.380 ± 0.01	
Bacillus tequilensis (6MS1)	MK713704	0-270	Halotolérante	0.96 ± 0.18	1.18 ± 0.66	0.00	6.69 ± 0.93	2.01 ± 0.11	0.2 M
				0.501 ± 0.02	0.685 ± 0.06	0.00	1.164 ± 0.27	1.029 ± 0.07	
Bacillus sp. (7MS1)	MK713705	10-150	Faiblement	0.00	0.00	0.46 ± 0.19	0.00	0.78 ± 0.01	0.2 M
				0.00	0.00	1.739 ± 0.14	0.00	0.509 ± 0.01	
Staphylococcus lentus (10MS1)	MK713706	0-300	Halotolérant	0.00	0.00	0.00	2.51 ± 0.24	0.00	0.2 M
				0.00	0.00	0.00	0.678 ± 0.08	0.00	
Staphylococcus lentus (13SS1)	MK713683	10-210	Faiblement	0.00	0.00	0.00	3.62 ± 0.12	0.00	0.2 M
				0.00	0.00	0.00	0.680 ± 0.05	0.00	
Exiguobacterium sp. (14SS1)	MK713684	10-180	Faiblement	0.00	0.09 ± 0.02	0.00	0.00	0.00	0.2 M
				0.00	0.336 ± 0.13	0.00	0.00	0.00	
Bacillus velezensis (15SSS1)	Seq-PartSelle	10-90	Faiblement	1.03 ± 0.17	1.84 ± 0.10	0.00	0.00	0.00	0.2 M
				0.982 ± 0.03	0.917 ±0.05	0.00	0.00	0.00	
Bacillus halotolerans (16SS1)	MK713685	10-90	Faiblement	0.00	0.00	0.00	4.63 ± 0.13	0.00	0.2 M
				0.00	0.00	0.00	0.561 ± 0.02	0.00	
Bacillus sp. (17SS1)	MK713686	10-60	Faiblement	0.00	3.23 ± 0.63	1.06 ± 0.13	0.00	0.00	0.2 M
				0.00	0.657 ± 0.10	0.982 ± 0.07	0.00	0.00	
Marinococcus albus (18SS1)	-	10-210	Faiblement	0.00	0.11 ± 0.01	0.00	0.00	0.00	0.2 M
				0.00	0.746 ± 0.01	0.00	0.00	0.00	
Brevibacterium permense (19SS1)	-	30-210	Modérée	1.82 ± 0.75	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.384 ± 0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	

Ureibacillus sp. (20SS1)	Seq-PartSelle	10-120	Faiblement	8.90 ± 3.85	0.00	0.00	0.00	0.00	0.2 M
				0.428 ± 002	0.00	0.00	0.00	0.00	
Bacillus pseudomycroSde (21MS1)	-	60-210	Modérée	0.00	1.36 ± 0.47	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.00	0.390 ± 0.07	0.00	0.00	0.00	
Bacillus sp. (24SS1)	MK713687	30-210	Modérée	0.00	0.00	0.00	12.95 ± 0.06	65.37 ± 4.60	1.0 M
				0.00	0.00	0.00	0.869 ± 0.02	0.557 ± 0.05	
Brevibacterium sp. (25MS1)	Seq-PartSelle	30-210	Modérée	0.09 ± 0.00	0.00	0.00	0.00	0.07 ± 0.11	1.0 M
				0.272 ± 0.03	0.00	0.00	0.00	0.431 ± 0.11	
Bacillus safensis (26SSS1)	MK713716	0-180	Halotolérante	0.00	0.00	0.00	0.00	41.41 ± 1.81	0.2 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	0.296 ± 0.01	
Bacillus halodurans (27SSS1)	-	150-240	Extrême	0.00	1.05 ±0.03	0.00	2.83 ± 0.05	0.00	2.5 M
				0.00	0.285 ± 0.06	0.00	0.811 ± 0.02	0.00	
Bacillus endophyticus (28SSS1)	-	150-210	Extrême	0.45 ± 0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	2.5 M
				0.326 ± 0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	
Salinococcus sp. (29SSS1)	-	150-330	Extrême	0.29 ± 0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	2.5 M
				0.498 ± 0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	
Bacillus atrophaeus (30SS1)	MK713688	10-60	Faiblement	0.00	0.00	0.00	0.97 ± 0.06	0.00	0.2 M
				0.00	0.00	0.00	0.919 ± 0.06	0.00	
Bacillus safensis (31SS1)	MK713689	60-120	Modérée	0.00	0.00	0.03 ± 0.01	0.00	0.00	1.0 M
				0.00	0.00	1.051 ± 0.04	0.00	0.00	
Pelagicoccus litoralis (32SS1)	-	30-180	Modérée	0.00	0.00	1.93 ± 0.24	0.00	0.00	1.0 M
				0.00	0.00	0.249 ± 0.05	0.00	0.00	
Bacillus endophyticus (33WMS2)	-	60-240	Modérée	0.15 ± 0.03	0.00	0.00	0.34 ± 0.01	0.00	1.0 M
				0.217 ± 0.11	0.00	0.00	1.026 ± 0.01	0.00	
Bacillus endophyticus (34WMS2)	-	30-240	Modérée	0.00	0.00	0.00	1.40 ± 0.01	0.00	1.0 M
				0.00	0.00	0.00	0.878 ± 0.05	0.00	

Bacillus velezensis (35SS1)	MK713690	0-90	Halotolérante	0.00 0.00	2.91 ± 0.31 0.474 ± 0.05	0.00 0.00	1.55 ± 0.09 1.581 ± 0.28	0.00 0.00	0.2 M
Bacillus selenitireducens (36WMS2)	-	30-180	Modérée	0.00 0.00	1.42 ± 0.14 0.463 ± 0.02	1.71 ± 0.42 0.852 ± 0.03	0.00 0.00	0.00 0.00	1.0 M
Salinibacterium sp. (37SS1)	-	30-90	Modérée	0.19 ± 0.02 0.178 ± 0.07	0.00 0.00	0.00 0.00	0.57 ± 0.01 0.742 ± 0.07	0.00 0.00	1.0 M
Bacillus algicola (38WMS2)	-	30-270	Modérée	0.13 ± 0.00 0.125 ± 0.10	0.00 0.00	0.24 ± 0.12 1.243 ± 0.11	0.00 0.00	14.38 ± 0.61 0.383 ± 0.06	1.0 M
Bacillus safensis (39WMS2)	Seq-PartSelle	0-120	Halotolérante	0.00 0.00	0.00 0.00	0.83 ± 0.10 1.396 ± 0.40	3.54 ± 0.34 1.102 ± 0.13	0.00 0.00	0.2 M
*Bacillus endophyticus (*40MS1)	-	30-120	Modérée	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.61 ± 0.42 0.813 ± 0.07	0.00 0.00	1.0 M
Bacillus safensis (400SS1)	Seq-PartSelle	10-120	Faiblement	0.00 0.00	0.00 0.00	1.89 ± 0.25 1.414 ±0.20	0.00 0.00	0.00 0.00	0.2 M
*Planomicrobium sp.(*401SS3)	MK713730	30-210	Modérée	0.00 0.00	0.09 ± 0.03 0.357 ± 0.05	0.01 ± 0.00 0.575 ± 0.09	0.00 0.00	0.00 000	1.0 M
Bacillus atrophaeus (402SS2)	MK713721	10-60	Faiblement	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	21.40 ± 3.02 0.930 ± 0.04	0.00 0.00	0.2 M
Exiguobacterium sp. (41SS1)	MK713691	30-180	Modérée	0.16 ± 0.05 0.328 ± 0.06	14.93 ± 2.57 0.604 ± 0.07	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.0 M
Bacillus sp. (42WMS1)	MK713718	10-120	Faiblement	10.02 ± 2.24 0.629 ± 0.04	0.04 ± 0.01 0.513 ± 0.03	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.2 M
Bacillus sp. (43SS1)	MK713692	10-180	Faiblement	1.72 ± 0.54 0.338 ± 0.03	12.98 ± 2.12 0.492 ±0.04	0.00 0.00	14.18 ± 2.30 0.00	2.86 ± 0.01 0.290 ± 0.01	0.2 M
Bacillus selenitireducens (44SS1)	-	10-180	Faiblement	0.00 0.00	0.76 ± 0.32 0.00	0.00 0.00	0.73 ± 0.31 0.00	0.00 0.00	0.2 M

Bacillus clausii (45SS1)	-	10-90	Faiblement	0.00	0.52 ± 0.09	0.00	1.31 ± 0.08	0.00	0.2 M
				0.00	0.930 ± 0.21	0.00	0.584 ± 0.03	0.00	
Lentibacillus juripiscarius (46SS1)	-	30-150	Modérée	0.57 ± 0.57	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.245 ± 0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	
Oceanobacillus oncorhynchi (47SS1)	MK713693	10-210	Faiblement	0.00	0.00	0.00	0.00	0.44 ± 0.10	0.2 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	0.371 ± 0.02	
Bacillus pseudomycroide (48SS1)	-	10-120	Faiblement	0.00	0.78 ± 0.35	0.00	0.00	1.35 ± 0.30	0.2 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	0.478 ± 0.05	
Ulvibacter sp. (49SS1)	-	10-180	Faiblement	0.00	0.00	0.00	0.00	2.40 ± 0.16	0.2 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	0.680 ± 0.04	
Puniceicoccus sp. (51WMS1)	-	30-180	Modérée	0.00	0.00	0.04 ± 0.02	0.00	0.00	1.0 M
				0.00	0.00	0.868 ± 0.03	0.00	0.00	
Brevibacterium samyangense (52WMS1)	-	30-150	Modéré	0.00	0.00	0.07 ± 0.02	0.00	0.00	1.0 M
				0.00	0.00	1.347 ± 0.13	0.00	0.00	
Cerasicoccus sp. (53WMS1)	-	30-180	Modérée	0.00	1.76 ± 0.50	0.00	0.00	0.00	1.0 M
					1.173 ± 0.05	0.00	0.00	0.00	
Pelagicoccus mobilis (54WMS3)	-	30-180	Modérée	0.00	0.00	0.00	0.06 ± 0.02	0.00	1.0 M
				0.00	0.00	0.00	1.128 ± 0.21	0.00	
Oceanobacillus picturae (55SSS1)	MK713717	150-210	Extrême	0.00	0.00	1.64 ± 0.18	0.00	31.13 ± 3.32	2.5 M
				0.00	0.00	0.507 ± 0.07	0.00	0.348 ± 0.02	
Halorubrum sp. (56WMS1)	-	150-330	Extrême	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10 ± 0.02	2.5 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	0.654 ± 0.01	
Bacillus selenitireducens (57WMS1)	-	150-210	Extrême	0.37 ± 0.28	1.24 ±0.06	0.00	0.00	0.00	2.5 M
				1.060 ± 0.02	0.448 ± 0.06	0.00	0.00	0.00	
Bacillus sp. (58WMS1)	MK713719	30-120	Modérée	0.07 ± 0.05	0.00	0.00	7.93 ± 1.34	66.51 ± 0.87	1.0 M
				0.451 ± 0.01	0.00	0.00	0.824 ± 0.02	0.407 ± 0.04	
Pelagicoccus mobilis (59SS1)	-	30-210	Modérée	0.00	0.02 ± 0.00	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.00	0.817 ± 0.01	0.00	0.00	0.00	

Pedobacter suwonensis (60SS1)	-	30-150	Modérée	0.00	0.00	0.02 ± 0.02	0.00	0.00	1.0 M
				0.00	0.00	0.489 ± 0.08	0.00	0.00	
Puniceicoccus sp. (61WMS2)	-	10-120	Faiblement	0.00	0.00	0.00	0.18 ± 0.10	0.00	0.2 M
				0.00	0.00	0.00	0.428 ± 0.15	0.00	
Marinococcus albus (62MS2)	-	0-270	Halotolérante	0.00	0.00	0.00	0.00	14.57 ± 2.64	0.2 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	1.032 ± 0.09	
Pelagicoccus litoralis (63SS1)	-	30-210	Modérée	0.00	0.00	0.22 ± 0.06	0.00	0.00	1.0 M
				0.00	0.00	1.149 ± 0.39	0.00	0.00	
Marinococcus albus (64SS1)	-	30-180	Modérée	0.00	0.00	0.00	0.00	5.74 ± 0.22	1.0 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	0.626 ± 0.30	
Bacillus selenitireducens (65SS1)	-	30-120	Modérée	0.00	0.00	0.00	0.00	75.98 ± 1.23	1.0 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	0.723 ± 0.03	
Bacillus halodurans (66SS1)	-	30-150	Modérée	0.00	5.47 ± 1.98	0.04 ± 0.02	1.45 ± 0.33	0.00	1.0M
				0.00	0.859 ± 0.30	1.352 ± 0.30	0.874 ± 0.06	0.00	
Shewanella sp. (67SS1)	MK713694	30-210	Modérée	0.00	0.02 ± 0.00	0.00	0.00	0.00	1.0M
				0.00	0.438 ± 0.01	0.00	0.00	0.00	
Bacillus pumilus (68WMS1)	MK713720	30-120	Modérée	1.02 ± 0.20	0.00	0.00	0.39 ± 0.07	0.00	1.0M
				0.270 ± 0.13	0.00	0.00	0.671 ± 0.12	0.00	
Bacillus thermoamylovorans (681MS1)	-	30-180	Modérée	0.91 ± 0.09	0.00	0.00	3.37 ± 0.09	0.00	1.0 M
				0.406 ± 0.10	0.00	0.00	1.522 ± 0.05	0.00	
Bacillus sp. (682MS1)	MK713707	30-120	Modérée	0.98± 0.06	3.70 ± 1.23	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.878 ± 0.12	0.961 ± 0.02	0.00	0.00	0.00	
Bacillus thermoamylovorans (69SS1)	-	150-270	Extrême	0.37 ± 0.06	0.00	0.00	0.00	8.87 ± 0.94	2.5 M
				0.482 ± 0.03	0.00	0.00	0.00	0.625 ± 0.05	
Sanguibacter inulinus (70SS1)	MK713695	150-210	Extrême	0.35 ± 0.23	0.00	0.00	0.00	25.74 ± 0.44	2.5 M
				0.753 ± 0.01	0.00	0.00	0.00	0.512 ± 0.04	

Ureibacillus sp. (71SS1)	-	150-240	Extrême	0.00	0.00	0.00	1.21 ± 0.18	0.00	2.5 M
				0.00	0.00	0.00	1.558 ± 0.20	0.00	
Halorubrum sp. (72SS1)	-	180-270	Extrême	0.00	0.00	0.00	1.42 ± 0.31	0.00	2.5 M
				0.00	0.00	0.00	1.683 ± 0.07	0.00	
Puniceicoccus sp. (73SS1)	-	150-210	Extrême	0.00	0.03 ± 0.02	0.00	0.00	0.00	2.5 M
				0.00	0.297 ± 0.01	0.00	0.00	0.00	
Bacillus endophyticus (74SS1)	-	150-210	Extrême	0.47 ± 0.32	0.00	0.00	0.00	53.29 ± 7.78	2.5 M
				0.772 ± 0.34	0.00	0.00	0.00	0.358 ± 0.01	
Staphylococcus lentus (77SS1)	MK713696	10-150	Faiblement	0.05 ± 0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.2 M
				1.117 ± 0.32	0.00	0.00	0.00	0.00	
Brevibacterium sp. (771SS1)	MK713697	10-90	Faiblement	0.31 ± 0.14	1.39 ± 0.29	0.35 ± 0.06	0.00	0.00	0.2 M
				0.691 ± 0.23	0.493 ± 0.13	1.232 ± 0.15	0.00	0.00	
Bacillus algicola (772SS1)	-	0-60	Halotolérante	0.49 ± 0.14	12.42 ± 2.42	0.00	0.00	1.38 ± 1.24	0.2 M
				0.478 ± 0.02	0.583 ± 0.07	0.00	0.00	0.477 ± 0.11	
Bacillus subtilis (78MS1)	MK713708	0-120	Halotolérante	0.00	0.77 ± 0.15	0.03 ± 0.15	0.00	0.00	0.2M
				0.00	0.672 ± 0.01	1.823 ± 0.20	0.00	0.00	
Puniceicoccus sp. (79MS1)	-	150-210	Extrême	0.00	0.01 ± 0.00	0.00	0.00	0.00	2.5 M
				0.00	0.295 ± 0.20	0.00	0.00	0.00	
Bacillus pseudomycroide (80SS1)	-	0-150	Halotolérante	0.00	1.52 ± 0.22	0.00	0.00	0.00	0.2 M
				0.00	0.668 ± 0.08	0.00	0.00	0.00	
Bacillus subtilis (810SS1)	MK713698	0-120	Halotolérante	0.00	0.00	0.00	7.16 ± 0.63	0.00	0.2 M
				0.00	0.00	0.00	0.620 ± 0.03	0.00	
Bacillus sp. (82SS1)	MK713699	30-150	Modérée	0.00	0.00	0.00	0.00	72.89 ± 2.46	1.0 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	0.461 ± 0.03	
Pelagicoccus mobilis (83SS1)	-	30-180	Modérée	0.00	0.00	0.00	0.06 ± 0.02	0.00	1.0 M
				0.00	0.00	0.00	0.805 ± 0.07	0.00	

Sandarakinotal sp. (84SS1)	-	30-120	Modérée	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.42 ± 0.08 0.665 ± 0.03	0.00 0.00	1.0 M
Ureibacillus sp. (85SS1)	-	30-180	Modérée	0.00 0.00	1.62 ± 0.12 0.366 ± 0.01	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.0 M
Bacillus safensis (86WMS2)	MK713728	0-60	Halotoérante	0.00 0.00	0.00 0.00	0.03 ± 0.01 1.970 ± 0.07	11.12 ± 0.49 1.322 ± 0.14	0.00 0.00	0.2 M
Bacillus sp. (87MS1)	MK713709	10-90	Faiblement	3.55 ± 1.45 0.614 ± 0.04	12.98 ± 0.08 0.476 ± 0.06	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.2 M
Bacillus atrophaeus (88WMS2)	MK713729	0-60	Halotolérante	3.46 ± 0.17 0.479 ± 0.07	1.73 ± 0.14 0.703 ± 0.01	0.00 0.00	0.39 ± 0.04 1.383 ± 0.03	0.00 0.000.00	0.2 M
Bacillus indicus (881MS1)	-	10-60	Faiblement	0.27 ± 0.03 0.420 ± 0.01	2.77 ± 0.22 0.414 ±0.18	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.2 M
Bacillus selenitireducens (882MS2)	-	10-60	Faiblement	0.00 0.00	0.05 ± 0.00 0.261 ± 0.10	0.00 0.00	0.39 ± 0.07 1.288 ± 0.02	0.00 0.00	0.2 M
Pelagicoccus croceus (89MS2)	-	30-150	Modérée	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.06 ± 0.05 0.664 ± 0.05	1.0 M
Bacillus thermoamylovorans (90MS2)	-	10-60	Faiblement	0.58 ± 0.05 0.433 ± 0.13	1.06 ± 0.03 0.528 ± 0.03	0.00 0.00	0.00 0.00	1.35 ± 0.33 0.712 ± 0.04	0.2 M
Pedobacter suwonensis (91MS2)	-	30-150	Modérée	0.00 0.00	0.00 0.00	0.02 ± 0.00 0.528 ± 0.04	0.00 0.00	0.00 0.00	1.0 M
Sandarakinotal sp. (92MS2)	-	30-150	Modérée	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.65 ± 0.17 0.524 ± 0.07	0.00 0.00	1.0 M
Puniceicoccus sp. (93MS2)	-	30-150	Modérée	0.23 ± 0.14 0.396 ± 0.08	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.0 M
Bacillus subtilis (94SS1)	MK713700	0-120	Halotolérante	0.02 ± 0.00 0.419 ± 0.08	0.90 ± 0.03 1.092 ± 0.18	0.00 0.00	0.21 ± 0.07 0.940 ± 0.07	0.00 0.00	0.2 M

Pedobacter suwonensis(95SS1)	-	30-150	Modérée	0.00 0.00	0.04 ± 0.01 1.251 ± 0.24	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.0 M
Marinilabilia sp. (96SS1)	-	30-180	Modérée	0.08 ± 0.04 0.512 ± 0.01	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.0 M
*Marinilabilia sp. (*97SS1)	-	30-180	Modérée	0.00 0.00	2.18 ± 0.86 0.599 ± 0.04	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.0 M
Lentibacillus juripiscarius (981WMS1)	-	30-210	Modérée	0.15 ± 0.02 0.550 ± 0.10	0.00 0.00	0.00 0.00	1.61 ± 0.01 1.144 ± 0.03	32.75 ± 5.32 0.693 ± 0.07	1.0 M
Bacillus selenitireducens (982WMS1)	-	10-60	Faiblement	0.47 ± 0.07 0.462 ± 0.08	0.27 ± 0.05 0.698 ± 0.14	0.00 0.00	1.24 ± 0.37 0.931 ± 0.04	0.97 ± 0.29 0.510 ± 0.07	0.2 M
Bacillus subtilis (99SS2)	MK713722	60-200	Modérée	2.75 ± 0.87 0.322 ± 0.03	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	24.78 ± 7.05 1.090 ± 0.07	1.0 M
Bacillus safensis (990SS2)	MK713723	10-60	Faiblement	2.26 ± 0.84 0.415 ± 0.17	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.2 M
Bacillus pumilus (100MS1)	-	30-120	Modérée	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.58 ± 0.16 1.133 ± 0.02	0.00 0.00	1.0 M
Bacillus halotolerans (101SS2)	MK713724	30-120	Modérée	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	9.13 ± 1.46 0.420 ± 0.03	1.0 M
Bacillus indicus (1011WMS2)	-	30-120	Modérée	0.00 0.00	1.36 ± 0.09 0.853 ± 0.16	0.00 0.00	10.85 ± 0.58 1.078 ± 0.14	18.76 ± 1.64 0.464 ± 0.05	1.0 M
*Lentibacillus juripiscarius (*1012MS2)	-	30-150	Modérée	0.62 ± 0.03 0.452 ± 0.02	0.00 0.00	0.01 ± 0.01 1.042 ± 0.05	1.28 ± 0.38 0.904 ± 0.02	0.00 0.00	1.0 M
Staphylococcus sp. (102SS1)	MK713701	30-150	Modérée	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.71 ±0.05 0.796 ± 0.11	0.00 0.00	1.0 M
Bacillus safensis (1020SS3)	MK713731	30-120	Modérée	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	3.40 ± 0.41 1.103 ± 0.21	37.96 ± 6.97 0.779 ± 0.05	1.0 M

Brevibacterium sp. (103SS1)	MK713702	0-120	Halotolérante	16.33 ± 4.77 0.343 ± 0.05	0.00 0.00	0.28 ± 0.05 1.011 ± 0.02	9.71 ± 2.91 1.029 ± 0.16	0.00 0.00	0.2 M
*Staphylococcus sp. (*1031MS1)	MK713710	0-150	Halotolérante	1.18 ± 0.04 0.371 ± 0.05	0.00 0.00	0.16 ± 0.01 1.469 ± 0.09	0.00 0.00	0.00 0.00	0.2 M
Lentibacillus juripiscarius(1032MS1)	-	0-210	Halotolérante	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	6.87 ± 0.46 0.969 ± 0.04	1.38 ± 0.12 0.777 ± 0.03	0.2 M
Salinibacteriumsp. (104SS2)	-	0-210	Halotolérante	0.00 0.00	21.50 ± 4.11 0.959 ± 0.18	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.2 M
Oceanobacillussp. (1040SS2)	Seq-PartSelle	0-270	Halotolérante	0.00 0.00	0.00 0.00	0.49 ± 0.11 1.671 ± 0.06	0.00 0.00	0.49 ± 0.11 0.570 ± 0.04	0.2 M
Bacillus safensis (105MS1)	MK713711	10-60	Faiblement	2.96 ± 1.03 0.503 ± 0.03	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.27 ± 0.12 0.575 ± 0.01	0.2 M
Pedobacter suwonensis(107MS1)	-	10-60	Faiblement	0.00 0.00	1.36 ± 0.02 0.610 ± 0.06	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.2 M
Lentibacillus juripiscarius(108MS1)	-	10-120	Faiblement	0.35 ± 0.22 0.424 ± 0.01	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.40 ± 0.04 0.483 ± 0.01	0.2 M
Bacillus safensis (109MS1)	MK713712	30-180	Modérée	2.49 ± 0.18 0.341 ± 0.05	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	21.44 ± 1.80 0.570 ± 0.01	1.0 M
Staphylococcus sp. (1091SS1)	SeqPartSelle	0-180	Halotolérante	0.44 ± 0.12 0.875 ± 0.03	0.00 0.00	0.00 0.00	6.50 ± 1.39 1.108 ± 0.14	0.00 0.00	0.2 M
Gemella sp. (10901SS1)	-	0-180	Halotolérante	0.92 ± 0.51 0.382 ± 0.07	1.66 ± 0.58 0.548 ± 0.01	0.00 0.00	0.00 0.00	1.47 ± 0.35 0.729 ± 0.01	0.2 M
Gemella sp. (1092SS1)	-	30-150	Modérée	0.07 ± 0.00 0.570 ± 0.12	1.70 ± 0.19 0.832 ± 0.04	0.00 0.00	0.00 0.00	25.14 ± 6.83 0.330 ± 0.01	1.0 M

Bacillus endophyticus (10902SS1)	-	10-60	Faiblement	0.29 ± 0.08	0.00	0.00	0.82 ± 0.20	0.00	0.2 M
				0.922 ± 0.24	0.00	0.00	0.972 ± 0.04	0.00	
Bacillus safensis (110SS2)	MK713725	0-210	Halotolérante	0.00	0.00	0.00	0.88 ±0.27	1.40 ± 0.22	0.2 M
				0.00	0.00	0.00	0.922 ± 0.07	0.464 ± 0.06	
Ureibacillus sp. (111MS1)	-	10-90	Faiblement	2.73 ± 1.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.2 M
				0.718 ± 0.21	0.00	0.00	0.00	0.00	
Sandarakinotal sp. (112MS1)	-	10-120	Faiblement	0.00	0.00	0.00	0.41 ± 0.08	0.00	0.2 M
				0.00	0.00	0.00	0.831 ± 0.10	0.00	
Bacillus pseudomycoide (113MS3)	-	10-60	Faiblement	0.00	1.01 ± 0.20	0.00	2.30 ± 0.28	19.56 ± 8.76	0.2 M
				0.00	0.498 ± 0.03	0.00	0.838 ± 0.07	0.582 ± 0.06	
Sandarakinotal sp. (114SS2)	-	30-180	Modérée	0.00	0.00	0.00	0.00	23.70 ± 7.65	1.0 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	0.505 ± 0.01	
Pelagicoccus mobilis (115SS2)	-	30-180	Modérée	0.00	0.07 ± 0.02	0.00	0.00	0.00	1.0 M
					1.054 ± 0.17	0.00	0.00	0.00	
Staphylococcus lentus (116SS2)	MK713726	30-150	Modérée	0.00	0.00	0.00	0.00	0.36 ± 0.14	1.0 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	0.502 ± 0.03	
Bacillus subtilis (117MS2)	MK713727	150-210	Extrême	0.54 ± 0.05	0.00	0.00	9.13 ± 0.62	4.26 ± 1.01	2.5 M
				0.382 ± 0.03	0.00	0.00	1.839 ± 0.03	0.452 ± 0.06	
Oceanobacillussp. (122MS1)	-	10-120	Faiblement	0.00	0.00	0.00	0.00	2.66 ± 0.45	0.2 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	0.749 ± 0.03	
Lentibacillus juripiscarius(123MS1)	-	10-90	Faiblement	0.09 ± 0.03	0.00	0.00	1.22 ± 0.17	1.47 ± 0.15	0.2 M
				0.436 ± 0.05	0.00	0.00	0.905 ± 0.05	0.400 ± 0.05	
Puniceicoccus sp. (125MS1)	-	10-60	Faiblement	0.00	0.00	0.00	0.21 ± 0.01	0.00	0.2 M
				0.00	0.00	0.00	0.582 ± 0.02	0.00	
Brevibacterium permense (126MS1)	-	10-90	Faiblement	0.18 ± 0.06	0.00	0.00	0.00	0.13 ± 0.06	0.2 M
				0.395 ± 0.05	0.00	0.00	0.00	0.826 ± 0.08	

Pedobacter suwonensis(127SSS1)	-	30-180	Modérée	0.98 ± 0.122	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.331 ± 0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	
Pedobacter suwonensis(128SSS1)	-	30-180	Modérée	0.00	2.00 ±0.67	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.00	1.032 ± 0.14	0.00	0.00	0.00	
Pedobacter suwonensis(129SSS1)	-	30-150	Modérée	0.00	1.46 ± 0.38	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.00	0.810 ± 0.05	0.00	0.00	0.00	
Cerasicoccus sp. (130SSS1)	-	60-180	Modérée	0.00	0.14 ± 0.03	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.00	0.692 ± 0.15	0.00	0.00	0.00	
Pedobacter suwonensis(131SSS1)	-	30-180	Modérée	0.00	0.00	0.00	0.77 ± 0.14	0.00	1.0 M
				0.00	0.00	0.00	0.496 ± 0.10	0.00	
Pelagicoccus croceus (132SSS1)	-	30-150	Modérée	0.00	1.22 ± 0.04	0.00	0.25 ± 0.11	0.00	1.0 M
				0.00	0.743 ± 0.17	0.00	0.596 ± 0.02	0.00	
Halorubrum sp. (133SSS1)	-	60-240	Modérée	0.00	0.74 ± 0.16	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.00	0.677 ± 0.09	0.00	0.00	0.00	
Ureibacillus sp. (134WMS3)	-	30-180	Modérée	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04 ± 0.01	1.0 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	0.389 ± 0.03	
Sandarakinotal sp. (135MS1)	-	150-270	Extrême	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03 ± 0.02	2.5 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	0.178 ± 0.05	
Ureibacillus sp. (139MS1)	-	30-150	Modérée	0.83 ± 0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.225 ± 0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	
Cerasicoccus sp. (140SS1)	-	30-180	Modérée	0.15 ±0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.268 ± 0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	
HaloBacillus sp. (141SS1)	-	30-210	Modérée	0.11 ± 0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.527 ± 0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	
Bacillus endophyticus (142MS1)	-	30-150	Modérée	0.85 ± 0.14	0.00	0.00	0.00	2.98 ± 0.61	1.0 M
				0.421 ± 0.02				0.498 ± 0.05	

Pedobacter suwonensis (143MS1)	-	30-150	Modérée	0.40 ± 0.05 0.407 ± 0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0 M
Chtonibacter sp. (144MS1)	-	30-150	Modérée	0.00 0.00	2.20 ± 0.57 0.690 ± 0.01	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.0 M
Pelagicoccus croceus (149SS1)	-	30-180	Modérée	0.00 0.00	0.54 ± 0.05 0.797 ± 0.03	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.0 M
Puniceicoccus sp. (150MS1)	-	30-150	Modérée	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.79 ± 0.15 0.301 ± 0.07	1.0 M
Ureibacillus sp. (152SS1)	-	30-150	Modérée	0.00 0.00	0.27 ± 0.06 0.756 ±0.04	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.0 M
Marinococcus albus (153SS1)	-	60-210	Modérée	0.00 0.00	7.55 ± 0.62 0.974 ± 0.09	0.00 0.00	0.00 0.00	5.15 ± 0.12 0.329 ± 0.05	1.0 M
Pedobacter suwonensis (154SS1)	-	30-150	Modérée	0.00 0.00	3.22 ± 0.44 0.716 ± 0.11	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.0 M
Puniceicoccus sp. (155SS1)	-	30-150	Modérée	0.00 	0.78 ± 0.10 0.572 ± 0.18	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.0 M
Pedobacter suwonensi s(156MS1)	-	10-180	Faiblement	0.39 ± 0.07 0.278 ± 0.06	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.2M
Ulvibacter sp. (157MS1)	-	10-180	Faiblement	0.02 ± 0.00 0.402 ± 0.01	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.2 M
Bacillus endophyticus (158WMS3)	-	0-90	Halotolérante	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	4.10 ± 0.40 0.597 ± 0.01	0.2M
Ureibacillus sp. (159MS1)	-	30-150	Modérée	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.36 ± 0.07 0.649 ± 0.02	0.00 0.00	1.0 M
Puniceicoccus sp. (160MS1)	-	30-120	Modérée	0.02 ± 0.02 0.135 ± 0.02	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.0 M

Puniceicoccus sp. (161MS1)	-	30-150	Modérée	0.17 ± 0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.491 ± 0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	
Pedobacter suwonensis (162WMS2)	-	30-150	Modérée	0.02 ± 0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.496 ± 0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	
Halomonas elongata (165WMS2)	Seq-PartSelle	60-270	Modérée	3.16 ± 0.34	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.305 ± 0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	
Oceanobacillussp. (166WMS2)	-	30-210	Modérée	0.00	0.00	0.00	0.00	1.74 ± 0.09	1.0 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	0.644 ± 0.02	
Pedobacter saltans (167WMS2)	-	30-150	Modérée	0.00	0.00	0.00	0.00	0.73 ± 0.14	1.0 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	0.862 ± 0.09	
Bacillus sp. (168MS1)	MK713713	30-150	Modérée	1.64 ± 0.21	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.499 ± 0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	
Salinibacteriumsp. (169MS1)	-	30-210	Modérée	0.00	0.72 ± 0.15	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.00	0.561 ± 0.04	0.00	0.00	0.00	
Pelagicoccus sp. (170MS1)	-	30-150	Modérée	0.00	0.81 ± 0.13	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.00	0.708 ± 0.02	0.00	0.00	0.00	
Puniceicoccus sp. (171MS1)	-	30-210	Modérée	0.63 ± 0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.511 ± 0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	
Jeotgalicoccus sp. (172MS1)	-	30-150	Modérée	0.00	1.74 ± 0.37	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.00	0.563 ± 0.01	0.00	0.00	0.00	
Bacillus pseudomycroide (175MS1)	-	30-180	Modérée	1.30 ± 0.02	3.42 ± 0.08	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.327 ± 0.08	0.854 ± 0.07	0.00	0.00	0.00	
Bacillus sp. (176MS1)	MK713714	30-150	Modérée	1.25 ± 0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.446 ± 0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	
Bacillus endophyticus (177MS1)	-	10-120	Faiblement	0.06 ± 0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.2 M
				0.207 ± 0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	

Jeotgalicoccus sp. (180MS1)	-	30-150	Modérée	0.00	0.02 ± 0.02	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.00	0.228 ± 0.05	0.00	0.00	0.00	
Pedobacter suwonensis (182MS1)	-	30-150	Modérée	0.57 ± 0.38	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.440 ± 0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	
Gemella sp. (184MS1)	-	10-120	Faiblement	0.00	0.00	0.00	0.00	9.33 ± 1.86	0.2 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	0.561 ± 0.01	
Pelagicoccus mobilis (185WMS3)	-	10-90	Faiblement	0.00	0.00	0.00	0.00	1.52 ± 0.12	0.2 M
				0.00	0.00	0.00	0.00	1.142 ± 0.05	
Oceanobacillus sp. (187SS2)	-	10-210	Faiblement	1.60 ± 0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.2 M
				0.432 ± 0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	
Puniceicoccus sp. (189SS2)	-	10-90	Faiblement	0.40 ± 0.19	0.00	0.00	0.00	0.15 ±0.06	0.2 M
				0.515 ± 0.01	0.00	0.00	0.00	0.402 ± 0.04	
Pedobacter suwonensis (190SS2)	-	30-150	Modérée	0.08 ± 0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0 M
				0.127 ± 0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	
Bacillus selenitireducens (191SS2)	-	10-60	Faiblement	0.49 ± 0.21	0.66 ± 0.04	0.00	0.00	0.00	0.2 M
				0.595 ± 0.01	1.022 ± 0.14	0.00	0.00	0.00	
Bacillus thermoamylovorans (195MS1)	-	10-60	Faiblement	1.88 ± 0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.2 M
				0.527 ± 0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	
Puniceicoccus sp. (196MS1)	-	10-60	Faiblement	0.17 ± 0.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.2 M
				0.444 ± 0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	
Bacillus subtilis (197WMS3)	MK713732	10-90	Faiblement	3.27 ± 0.62	0.00	0.00	0.00	0.27 ± 0.16	0.2 M
				0.682 ± 0.08	0.00	0.00	0.00	0.518 ± 0.03	
Bacillus endophyticus (198MS1)	-	30-150	Modérée	0.15 ± 0.00	0.00	0.00	0.00	32.28 ± 1.99	1.0 M
				0.481 ± 0.07	0.00	0.00	0.00	0.698 ± 0.02	

Staphylococcus lentus (199MS1)	MK713715	10-150	Faiblement	0.00 0.00	5.56 ± 1.08 0.736 ± 0.01	0.00 0.00	0.00 0.00	1.46 ± 0.06 0.674 ± 0.01	0.2 M
Bacillus indicus (201MS1)	-	30-150	Modérée	0.00 0.00	0.98 ± 0.07 0.603 ± 0.05	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.0 M
Pelagicoccus litoralis (203WMS2)	-	30-210	Modérée	1.05± 0.12 0.418 ± 0.04	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.0 M
Puniceicoccus sp. (207WMS2)	-	30-150	Modérée	1.39 ± 0.61 0.491 ± 0.02	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.0 M
Ulvibacter sp. (208MS1)	-	10-120	Faiblement	1.38 ± 0.13 0.867 ± 0.02	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.2 M
Pedobacter suwonensis (209MS1)	-	10-60	Faiblement	0.47 ± 0.13 0.508 ± 0.02	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.2 M
Halomonas sp. (228SS1)	-	150-300	Extrême	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	3.56 ± 1.28 0432 ± 0.12	2.5 M
Pelagicoccus litoralis (229MS1)	-	150-270	Extrême	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.41 ± 0.28 0.542 ± 0.05	2.5 M
Pelagicoccus litoralis (230WMS1)	-	0-210	Halotolérante	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.87 ± 0.69 0.664 ± 0.01	0.2 M
Pelagicoccus litoralis (231WMS1)	-	0-210	Halotolérante	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	1.66 ± 0.41 0.616 ± 0.01	0.2 M
Souches contrôles									
*Bacillus subtilis (*DSM 347 de la collection du Laboratoire de Biotechnologie)			Halotolérante	0.21 ± 0.01 0.300 ± 0.01	3.37 ± 0.63 0.404 ± 0.01	1.57 ± 0.32 1.132 ± 0.04	4.36 ± 0.19 0.848 ± 0.04	3.74 ± 0.85 0.136 ± 0.01	0.2 M
Dickeya solanii (SP2222 du CNRS-Paris, Fr)			Halotolérante	2.25 ± 0.39 0.360 ± 0.03	0.00 0.00	4.11± 0.30 0.126 ± 0.01	7.08 ± 0.48 0.726 ± 0.03	6. 90 ± 0.47 0.193 ± 0.02	0.2 M

Annexe 3

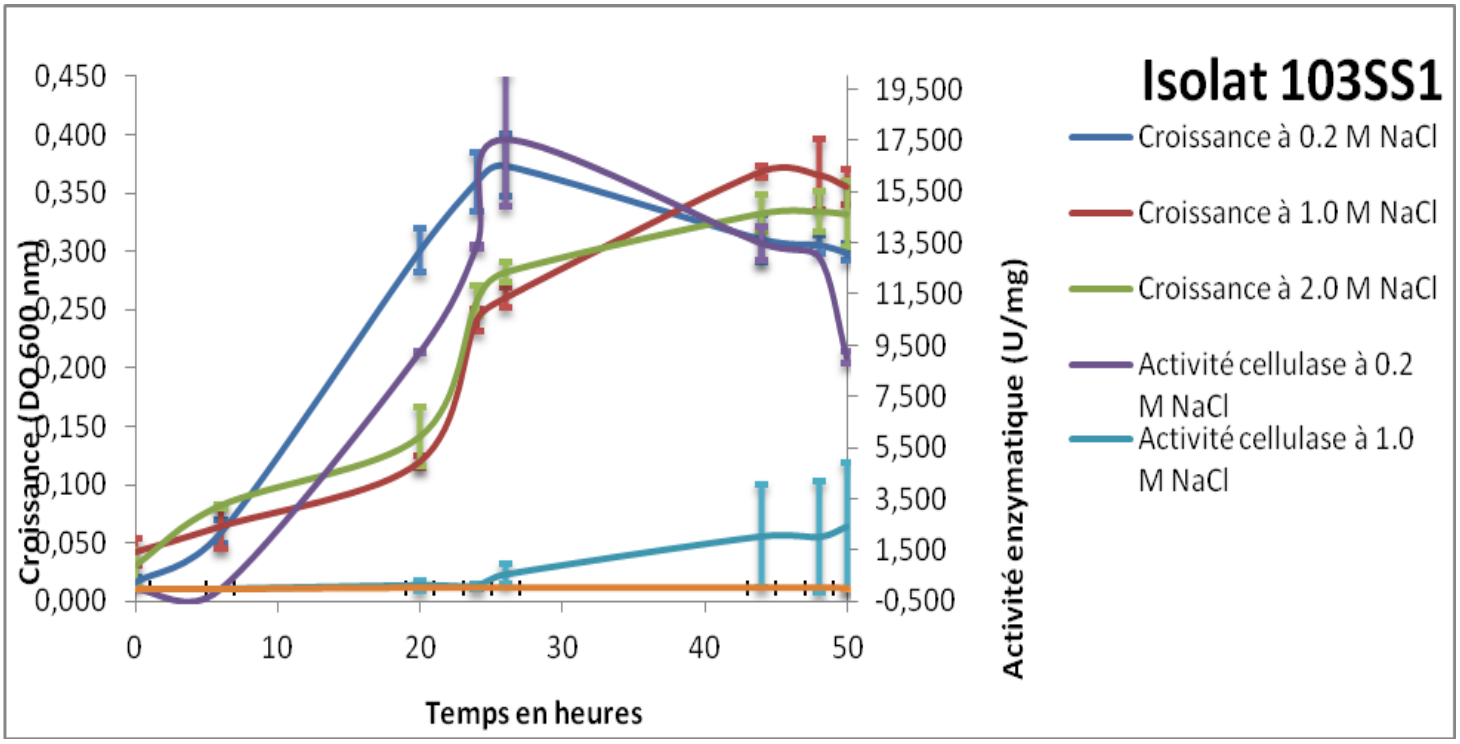


Figure A3.1. Cinétique de production de cellulase de la souche *Brevibacterium sp.* 103SS1 à différentes concentrations en NaCl.

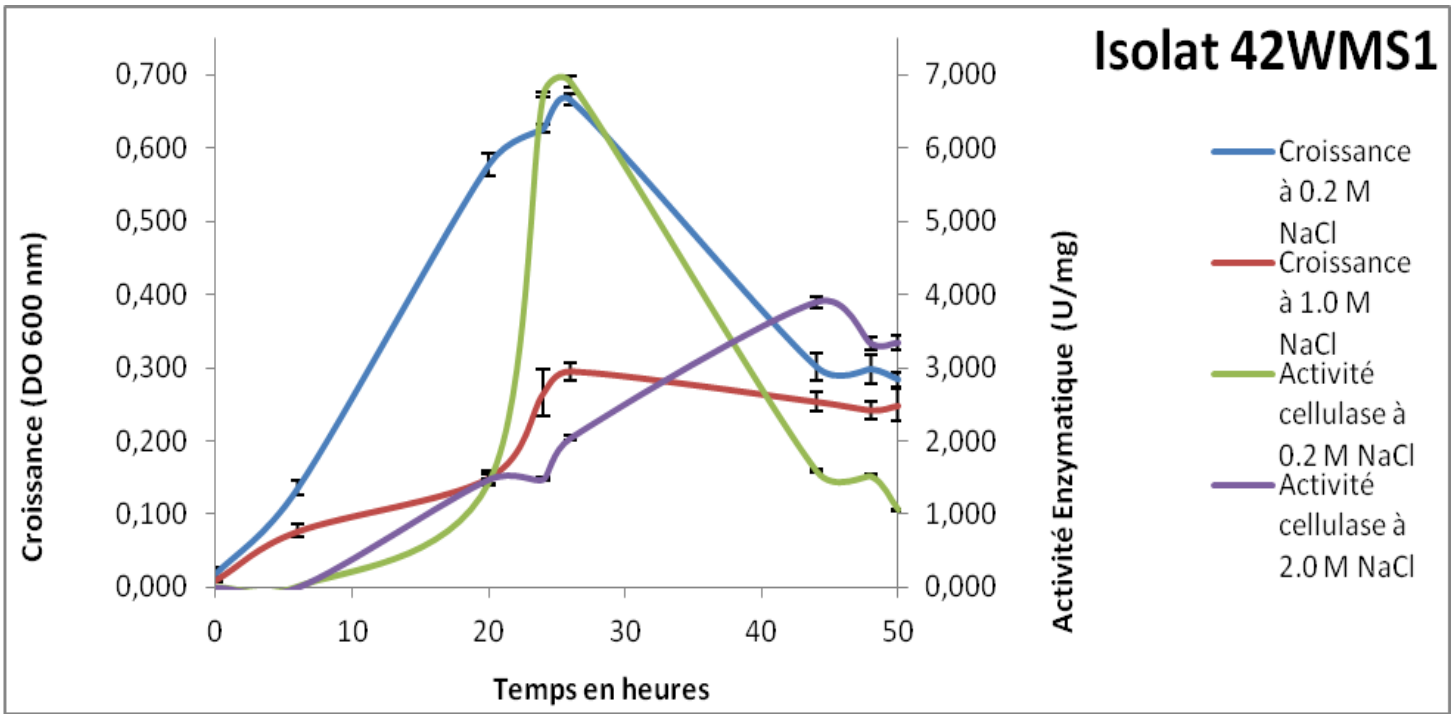


Figure A3.2. Cinétique de production de cellulase de la souche *Bacillus sp.* 42WMS1 à différentes concentrations en NaCl.

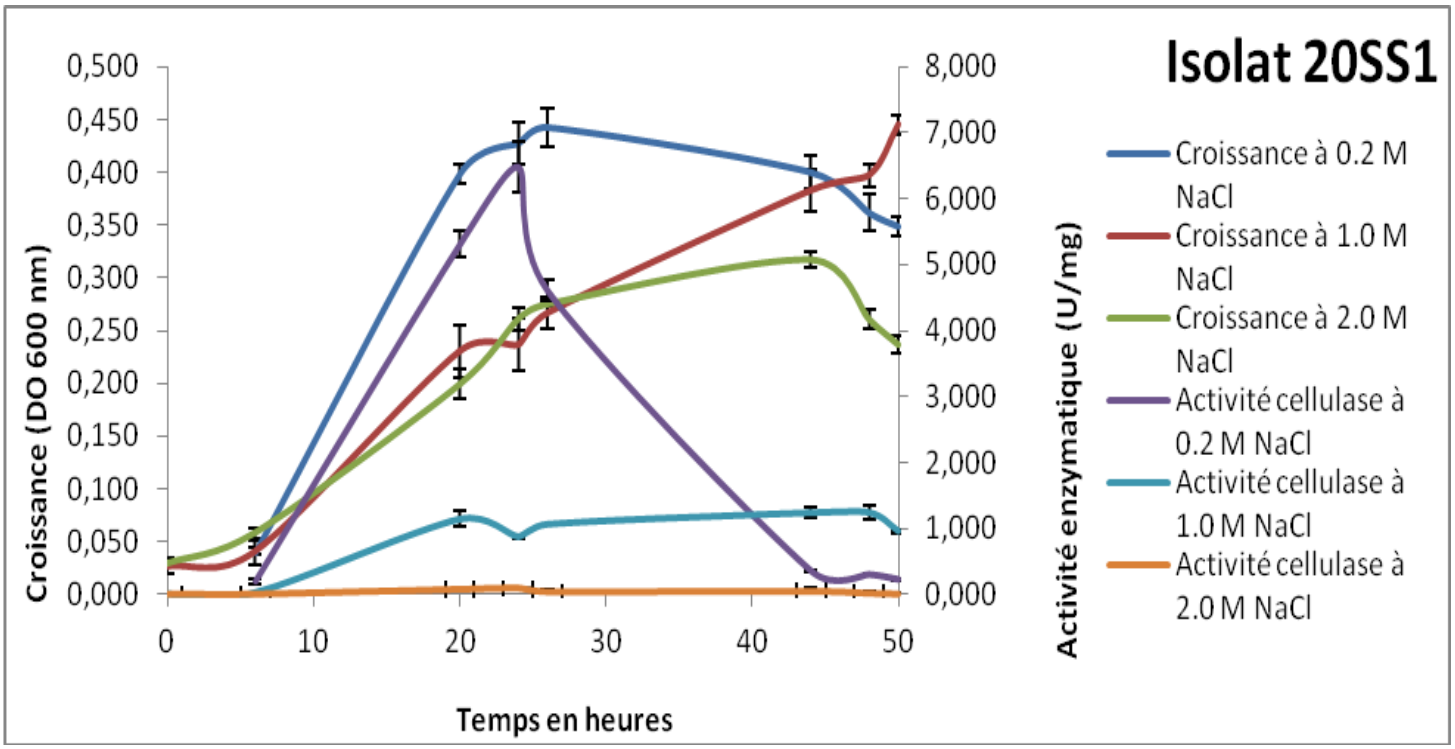


Figure A3.3. Cinétique de production de cellulase de la souche *Ureibacillus sp.* 20SS1 à différentes concentrations en NaCl.

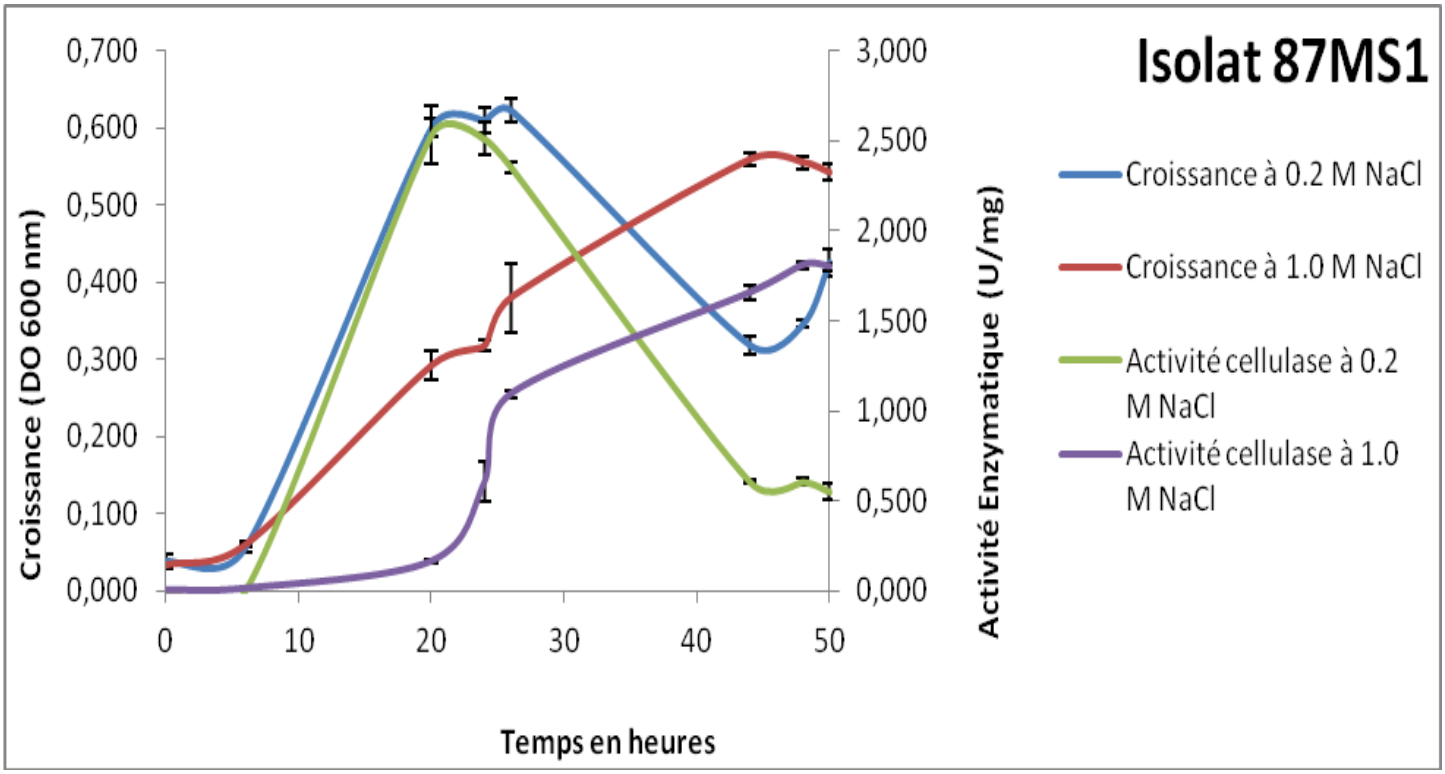


Figure A3.4. Cinétique de production de cellulase de la souche *Bacillus sp*. 87MS1 à différentes concentrations en NaCl.

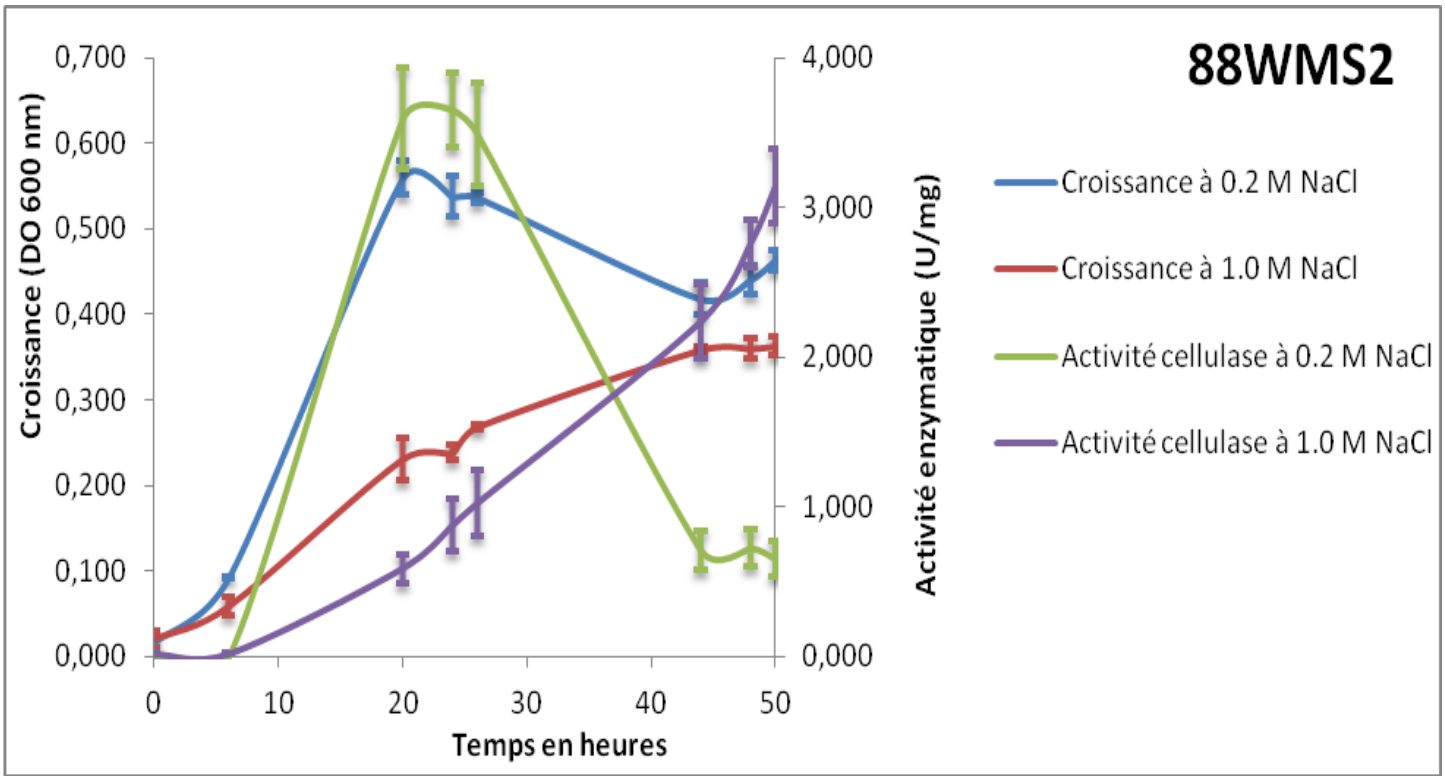


Figure A3.5. Cinétique de production de cellulase de la souche *Bacillus atrophaeus* 88WMS2 à différentes concentrations en NaCl.

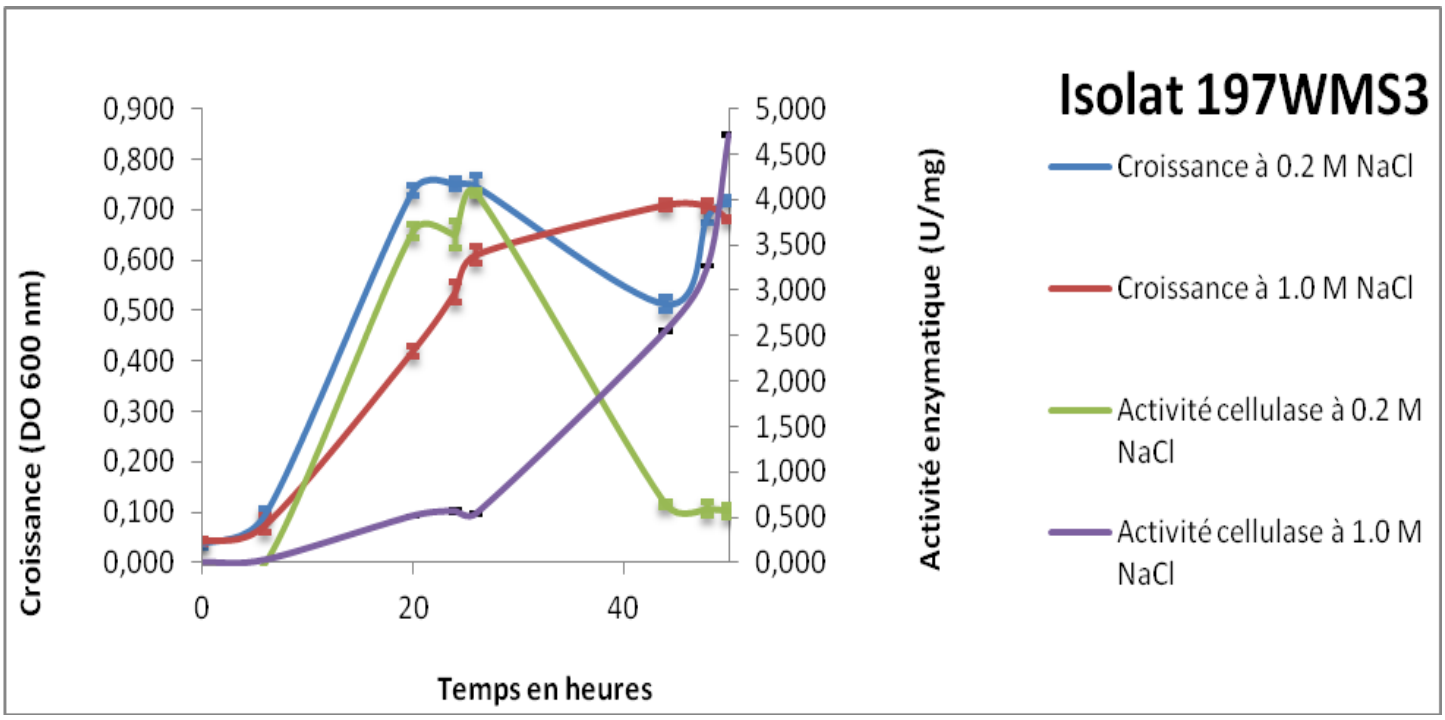


Figure A3.6. Cinétique de production de cellulase de la souche *Bacillus subtilis* 197WMS3 à différentes concentrations en NaCl.

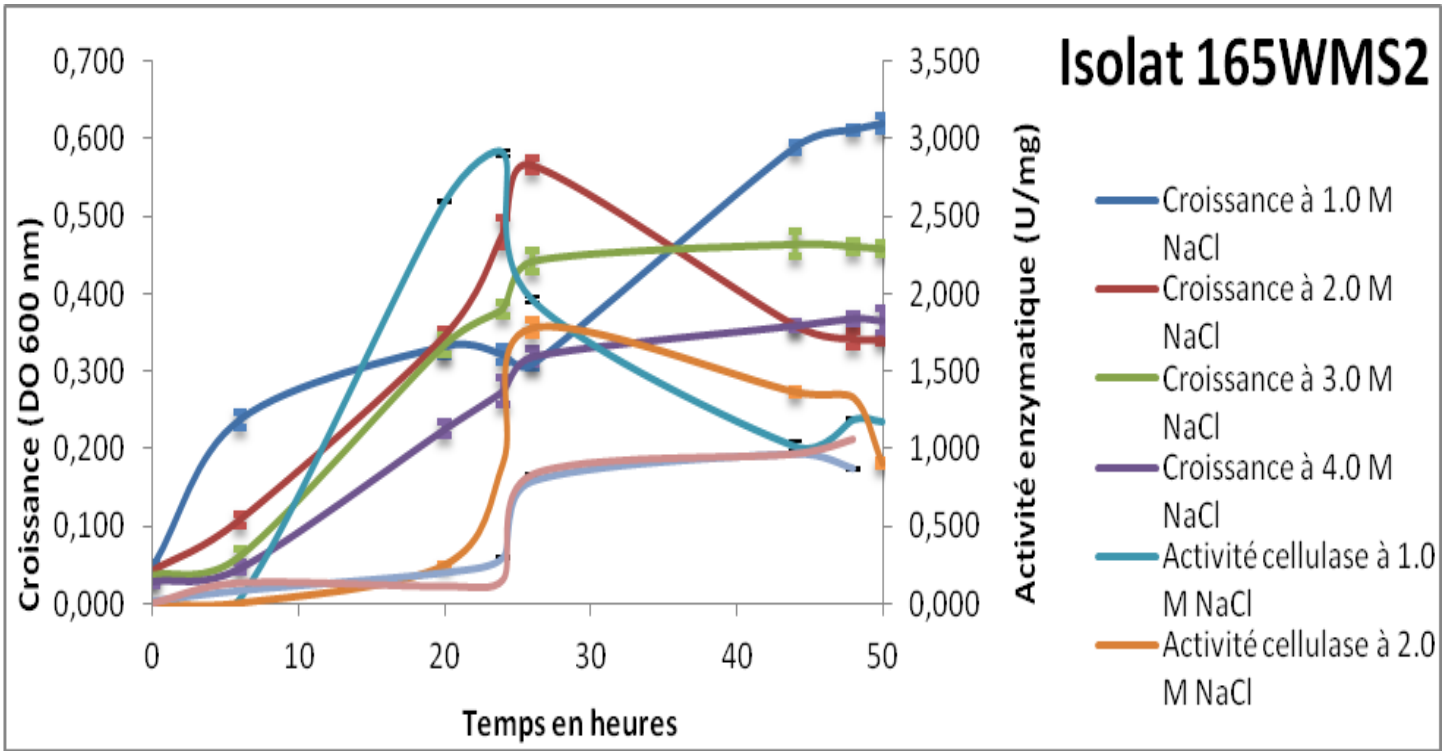


Figure A3.7. Cinétique de production de cellulase de la souche *Halomonas elongata* 165WMS2 à différentes concentrations en NaCl.

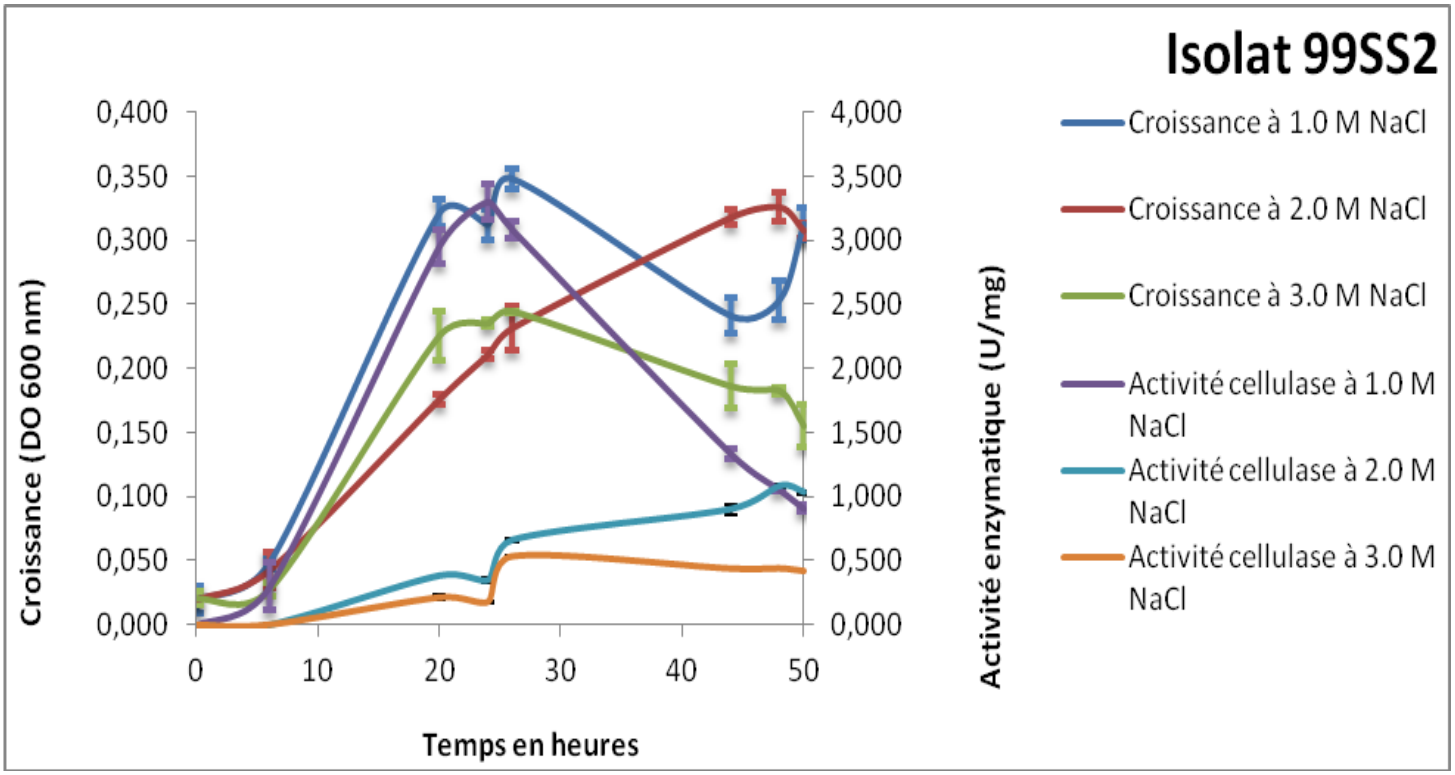


Figure A3.8. Cinétique de production de cellulase de la souche *Bacillus subtilis* 99SS2 à différentes concentrations en NaCl.

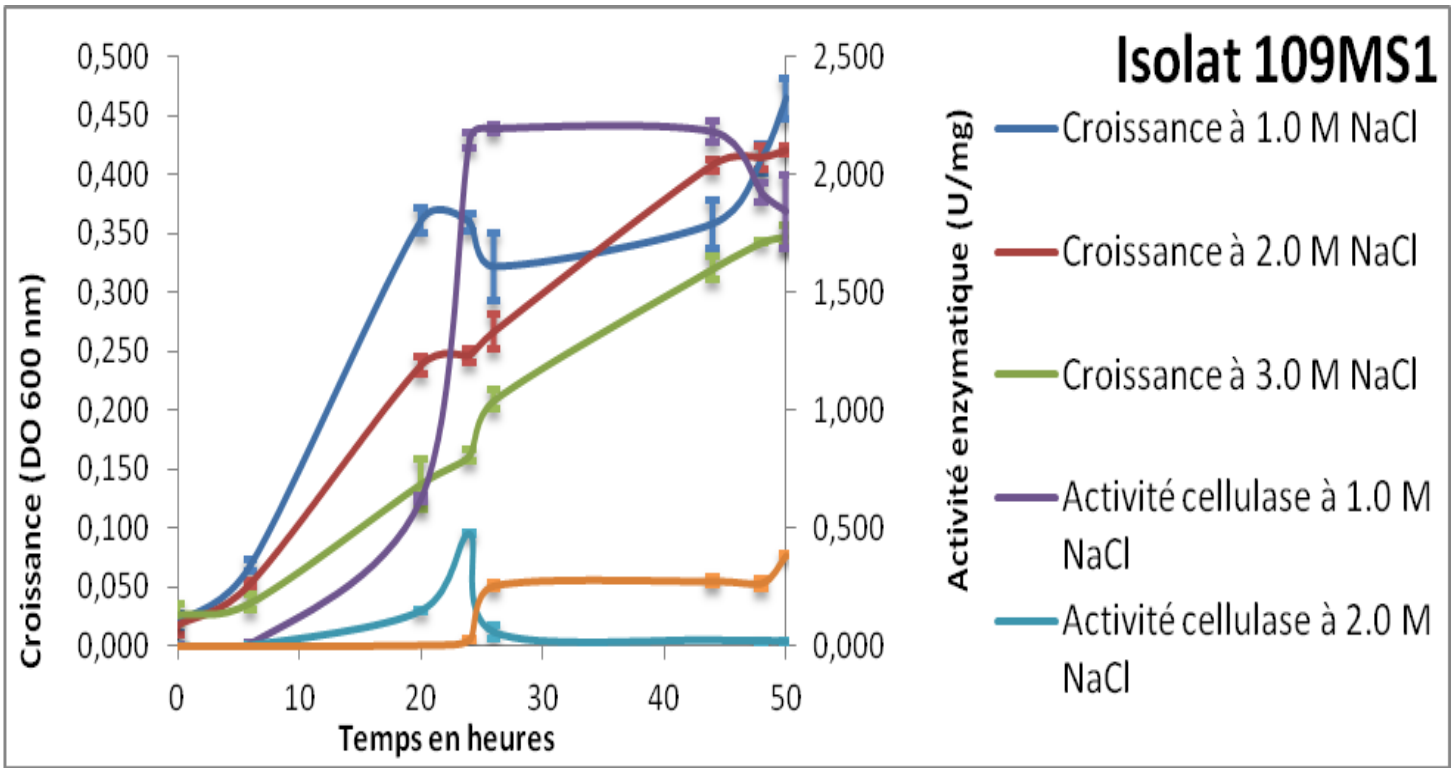


Figure A3.9. Cinétique de production de cellulase de la souche *Bacillus safensis*109MS1 à différentes concentrations en NaCl.

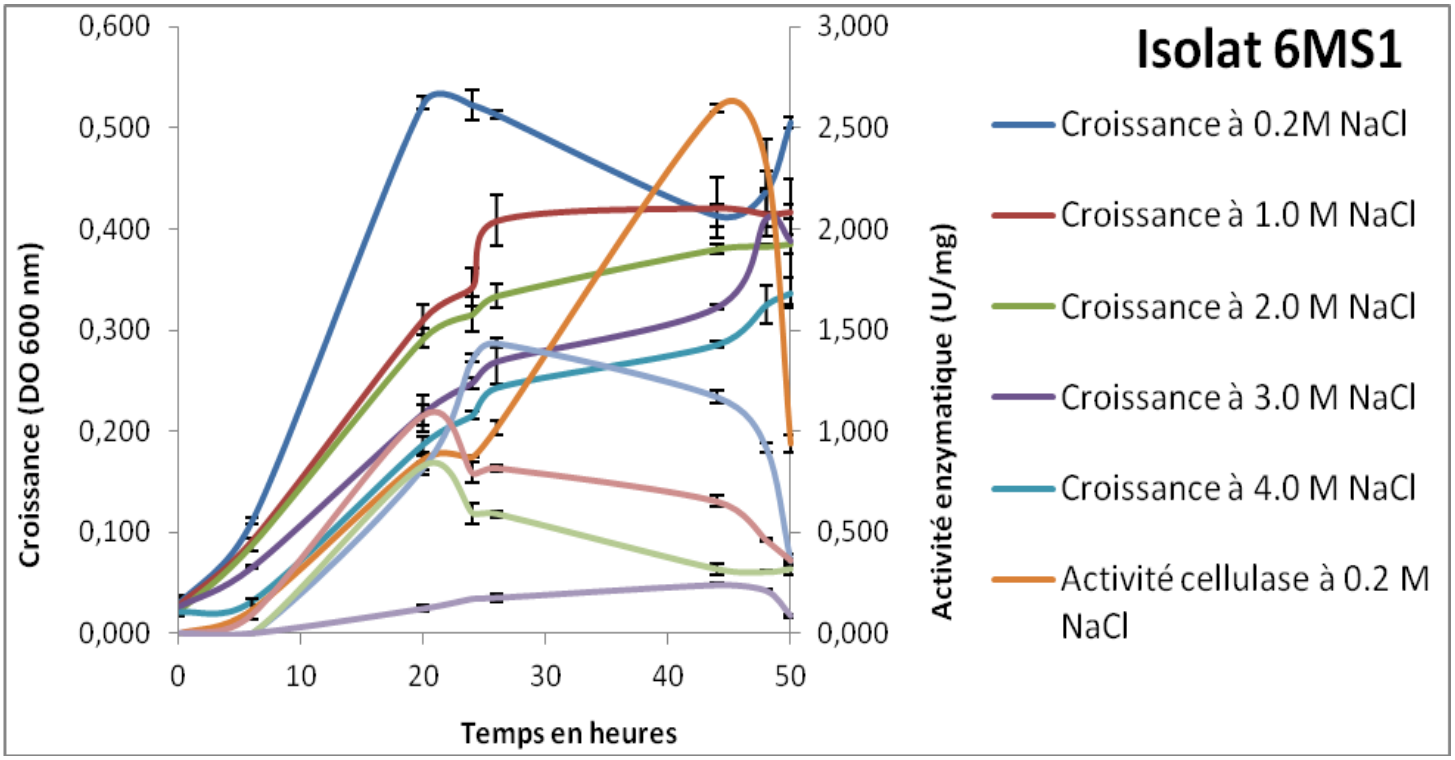


Figure A3.10. Cinétique de production de cellulase de la souche *Bacillus tequSlensSs* 6MS1 à différentes concentrations en NaCl.