



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie ميكروبيولوجيا قسم

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Étude des caractéristiques physico-chimiques et enzymatiques de quelques bactéries halophiles

Présenté par :

Amel Zitouni

Oscar Amos Gomba

Le : 19/06/2024

Jury d'évaluation :

Présidente : DERABLI Besma (MAB - U Constantine 1, Frères Mentouri).

Encadrante : MERIANE Ilhem (MAA- U Constantine 1, Frères Mentouri).

Examinatrice : Almi Hiba (MCB - U Constantine 1, Frères Mentouri)

Année universitaire
2023 –2024

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Allah pour son soutien et sa guidance continus tout au long de notre parcours.

*Nous souhaitons commencer par exprimer nos sincères remerciements à **Madame Meriane Ilhem** pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et sa patience durant l'encadrement de notre projet. Son soutien a été inestimable.*

*Notre gratitude profonde va à **Mme Derabli Besma**, pour nous avoir fait l'honneur d'accepter le rôle de présidente du jury de notre travail. Nous remercions également **Mme Almi Hiba** pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'évaluer notre travail.*

Nous sommes reconnaissants envers les ingénieurs des laboratoires : Labo 14, Labo 9 , Labo 8, Labo 11, Labo 16, le laboratoire de Biophysique, et le laboratoire de Microbiologie RDC. Nous apprécions tout le soutien et le temps qu'ils nous ont accordés pendant les trois derniers mois de notre projet.

Nous tenons à remercier l'administration de l'Université de Constantine 1, en particulier le Département de Microbiologie, pour leur soutien immense et les connaissances qu'ils nous ont transmises au cours des cinq dernières années, nous permettant de réaliser ce projet.

Enfin, nous remercions également nos camarades de la promotion de Master 2023-2024 pour leur camaraderie et leur soutien.

Dédicace

À mes très chers parents

Abdelhak et **Saida**, quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point vous remercier comme il se doit. Votre affection me couvre, votre bienveillance me guide et votre présence à mes cotés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

À mes très chers frères **Hichem** et **Abd El Raouf**

À ma sœur **Linda**, ma moitié et mon beau-frère **Borhen**

À ma personne préférée **Wassim**

Et enfin à mon binôme **Oscar**.

Amel

Dédicace

Je dédie ce mémoire :

À mes parents, ma chère mère **Jane Gomba** et mon défunt père **Amos Gomba**, que son âme repose en paix. Je suis éternellement reconnaissant pour leur amour, leur soutien, leurs sacrifices, leurs conseils et leur guidance tout au long de ma vie.

À mes **frères** et **sœurs**, merci pour tout le soutien et les sacrifices que vous avez faits pour moi.

À ma chère amie **Imene**, merci infiniment.

À tous mes amis de la cité universitaire, votre amitié est précieuse pour moi.

Et enfin, à mon binôme **Amel Zitouni**, merci d'avoir été présent à chaque étape de ce parcours.

Oscar

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction1

Partie I : Revue bibliographique

1/ Définition et classification des microorganismes halophiles..... 2

2/ Diversité taxonomique des microorganismes halophiles 2

2.1/ Domaine des archées..... 2

2.2/ Domaine des bactéries..... 4

2.2.1/ Le phylum Bacillota 4

2.2.2/ Le phylum Actinobacteriota 5

2.2.3/ Le phylum Pseudomonadota 5

2.2.4/ Le phylum Fusobacteriota 5

2.2.5/ Le phylum Bacteroidota 5

2.2.6/ Le phylum Spirochaetota..... 6

2.2.7/ Le phylum Cyanobacteri ou Cyanobacteriota 6

2.3/ Domaine des Eucaryotes 6

3/ Facteurs physico-chimiques affectant la croissance des microorganismes halophiles.....	7
3.1/pH.....	7
3.2/ Température	7
3.3/ Salinité.....	7
3.4/ Oxygène	7
4/ Mécanismes d'adaptation des microorganismes halophiles	8
4.1/ La stratégie “high-salt-in”	8
4.2/ La stratégie “low-salt-in”	9
5/ Intérêts biotechnologiques des microorganismes halophiles.....	9
5.1/ Applications directe de la bactérie halophile	9
5.1.1/ Domaine agroalimentaire	9
5.1.2/ Clonage moléculaire	10
5.1.3/ Biorémediation	10
5.2/ Application des métabolites produits par la bactérie halophile	10
5.2.1/ Enzymes	10
5.2.2/ Solutés compatibles.....	11
5.2.3/ Pigments caroténoïdes	11
5.2.4/ Exo-polysaccharides.....	11

Partie II : Matériel et méthodes

1/ Provenance des bactéries halophiles.....	13
2/ Revivification des bactéries halophiles.....	13
3/ Repiquage et purification.....	13
4/ Étude des caractères physico-chimiques des bactéries halophiles.....	14
4-1/ Effet de différents pH sur la croissance des bactéries halophiles	14
4-2/ Effet de différentes concentrations en NaCl sur la croissance des bactéries halophiles....	15
4-3/Effet de différentes températures sur la croissance des bactéries halophiles	16
5/ Étude enzymatique : recherche de la L-arginase et de la L-méthionase.....	17

Partie III : Résultats et discussion

1/ Revivification, repiquage et purification	18
2/ Étude des caractères physico-chimiques des bactéries halophiles.....	18
2.1/ Étude de l'effet de différents caractères physico-chimiques sur la croissance de la totalité des bactéries halophiles étudiées.....	18
2.1.1/ Effet de la pH sur la croissance des bactéries halophiles	18
2.1.2/ Effet de la concentration en NaCl sur la croissance des bactéries halophiles	20
2.1.3/ Effet de la température sur la croissance des bactéries halophiles	21
2.2/ Étude de l'effet de différents caractères physico-chimiques sur la croissance de chaque souche halophile étudiée	23

2.2.1/ Étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de la souche n°1	23
2.2.2/ Étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de la souche n°2	24
2.2.3/ Étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de la souche n°5	26
2.2.4/ Étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de la souche n°10	28
2.2.5/ Étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de la souche n°13	29
2.2.6/ Étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de la souche n°18	31
3/ Recherche de la production de la L - arginase et de la L – méthioninase	34
Conclusion et perspectives.....	37
Références bibliographiques.....	38

Annexe

Résumés

Liste des tableaux

Tableau 1	Exemples de solutés organiques zwitterioniques synthétisés par des procaryotes	p 9
Tableau 2	Exemples d'enzymes produites par les microorganismes halophiles et leurs applications en biotechnologie	p 11
Tableau 3	Les résultats de l'étude de l'effet du paramètre de pH sur la croissance des bactéries halophiles après 10 jours d'incubation.	p 19
Tableau 4	Les résultats de l'étude de l'effet du paramètre de NaCl sur la croissance des bactéries halophiles après 10 jours d'incubation.	p 20
Tableau 5	Les résultats de l'étude de l'effet de la température sur la croissance des bactéries halophiles après 10 jours d'incubation.	p 22
Tableau 6	Les résultats de l'étude de différents paramètres physico-chimiques sur la croissance de souche n°1 après 10 jours d'incubation.	p 23
Tableau 7	Les résultats de l'étude de différents paramètres physico-chimiques sur la croissance de souche n°2 après 10 jours d'incubation.	p 25
Tableau 8	Les résultats de l'étude de différents paramètres physico-chimiques sur la croissance de souche n°5 après 10 jours d'incubation.	p 27
Tableau 9	Les résultats de l'étude de différents paramètres physico-chimiques sur la croissance de souche n° 10 après 10 jours d'incubation.	p 28
Tableau 10	Les résultats de l'étude de différents paramètres physico-chimiques sur la croissance de souche n° 13 après 10 jours d'incubation.	p 30
Tableau 11	Les résultats de l'étude de différents paramètres physico-chimiques sur la croissance de souche n°18 après 10 jours d'incubation.	p 32
Tableau 12	Les résultats de la production des enzymes L-arginase et L-méthioninase par les bactéries halophiles après 10 jours d'incubation.	p 34

Liste des figures

Figure 1	Classification phylogénétique des archées halophiles appartenant à la classe Halobacteria.	p 3
Figure 2	Exemple d'une algue halophile : <i>Dunaliella salina</i> .	p 6
Figure 3	La stratégie high-salt-in exercée à travers la membrane cellulaire d'une bactérie halophile.	p 8
Figure 4	Photographie des milieux de culture utilisés pour la revivification.	p 13
Figure 5	Photographies des milieux de culture liquides et solides utilisés pour l'étude du paramètre pH.	p 15
Figure 6	Photographie des milieux de culture utilisés pour l'étude du paramètre NaCl.	p 16
Figure 7	Photographie des milieux de culture utilisés pour l'étude du paramètre température.	p 16
Figure 8	Photographie des milieux de culture utilisés pour l'étude des tests enzymatiques.	p 17
Figure 9	Photographies de deux souches halophiles : 2 et 10, après repiquage et purification (après 48h d'incubation).	p 18
Figure 10	Les résultats de l'étude de l'effet du paramètre pH sur la croissance des bactéries halophiles après 10 jours d'incubation.	p 19
Figure 11	Les résultats de l'étude de l'effet du paramètre de NaCl sur la croissance des bactéries halophiles après 10 jours d'incubation.	p 21
Figure 12	Les résultats de l'étude de l'effet de la température sur la croissance des bactéries halophiles après 10 jours d'incubation.	p 22
Figure 13	Photographies de résultats de la croissance de la souche n°1 aux 0,5% et 15% de NaCl après 7 jours d'incubation, et à pH 8 après 10 jours d'incubation.	p 24
Figure 14	Photographies de la croissance de la souche n°2 aux pH 8 (après 3 jours), 20%NaCl (après 7 jours d'incubation), et 40°C (après 10 jours d'incubation).	p 26
Figure 15	Photographies de la croissance de la souche n°5 aux pH 8, 20% NaCl et 10% NaCl après 7 jours d'incubation.	p 27
Figure 16	Photographies de la croissance de la souche n°10 aux pH 6 (après 3 jours d'incubation), 3%NaCl, 50°C (après 10 jours d'incubation).	p 29
Figure 17	Photographies de la croissance de la souche n°13 aux pH 10 et 15% NaCl (après 10 jours), et 40°C (après 7 jours d'incubation).	p 31

Figure 18	Photographies de la croissance de la souche n°18 aux pH 9, pH 10, et à température 40°C après 10 jours d'incubation.	p 33
Figure 19	Les résultats de la production des L-arginase et L-méthioninase par les souches halophiles après 10 jours d'incubation.	p 34
Figure 20	Photographies démontrant la production de la L - méthioninase et la L - arginase par la souche n°1.	p 35
Figure 21	Photographies démontrant l'absence de la production de la L - méthioninase et la L - arginase par la souche n° 13 et la souche n°18.	p 35

Introduction

L'environnement est un lieu de vie relativement stable identifié par un certain nombre de caractéristiques qui vont déterminer les conditions de vie des êtres qui y vivront.

Un environnement est considéré extrême si ses facteurs physico-chimiques sont situés en dehors de la gamme des environnements qualifiés de normaux. À l'heure actuelle les principaux paramètres physico-chimiques pris en considération pour classer les milieux extrêmes sont : la température, le pH, la teneur en eau, la pression et la concentration en sel (**Cui et Dyall-Smith, 2021 ; Lach *et al.*, 2021**). Ces environnements sont souvent colonisés par des organismes appelés « extrémophiles », bien adaptés à ces conditions physico-chimiques spécifiques. Les premiers extrémophiles isolés font partie des halophiles, organismes qui ne peuvent croître qu'en présence de sel, généralement sous forme de chlorure de sodium (NaCl) (**Toffin, 2020**).

La diversité phylogénétique des halophiles existe dans les trois domaines de la vie : Eucarya, Bacteria et Archaea, mais le domaine « Bacteria » regroupe la plus grande diversité des halophiles (**Daoud et Ben Ali, 2020**).

Les bactéries halophiles représentent une source potentielle de molécules nouvelles, des substances osmotiquement actives (solutés compatibles), des protéines, des enzymes extracellulaires, des lipides et des polysaccharides, et elles constituent donc de véritables candidates pour de nombreuses applications biotechnologiques et industrielles dans plusieurs domaines : alimentaire, agronomique et industriel (**Drissi *et al.*, 2020**).

Dans ce contexte, notre étude porte sur l'étude des caractères physico-chimiques et enzymatiques de quelques bactéries halophiles. Elle est divisée en plusieurs parties : une première partie qui représente les données bibliographiques liées aux bactéries halophiles et leurs caractéristiques. Une deuxième partie consacrée à l'étude de l'effet de trois paramètres physico-chimiques (température, pH, NaCl) sur la croissance des bactéries halophiles ainsi que leur aptitude à produire deux diverses enzymes : la L-arginase et la L-méthioninase. Une troisième partie qui consiste à discuter et comparer les résultats obtenus.

Une dernière partie qui soulignera la conclusion finale et les perspectives de cette étude.

Partie I :
Revue
bibliographique

1/ Définition et classification des microorganismes halophiles

Les halophiles représentent une classe intéressante d'extrémophiles. Ce sont des organismes qui aiment le sel et qui croissent dans des environnements salins. Les organismes halophiles peuvent aussi se développer dans milieu hypersalin nécessitant au moins 0,2 M de chlorure de sodium (NaCl) pour leur croissance. Ils peuvent être classés comme légèrement, modérément ou extrêmement halophiles en fonction de leurs besoins en NaCl.

Les légèrement halophiles sont des micro-organismes qui peuvent croître à des concentrations de NaCl de 0,2 à 0,85 M (soit 1 à 5 %).

Les halophiles modérés se développent de manière optimale à des concentrations comprises entre 0,85 et 3,4 M de NaCl (soit 5 à 20%).

Les halophiles extrêmes peuvent se développer de manière optimale à des concentrations de NaCl de 3,4 à 5,1 M (soit 20 à 30 %).

Les organismes halotolérants ont la capacité de se développer dans environnements salins, et même en absence d'une forte concentration en sel (**Mukhtaret *al.*, 2020**).

2/ Diversité taxonomique des microorganismes halophiles

Les organismes halophiles appartiennent aux trois domaines de la vie : Eucarya, Bacteria et Archaea. Cependant, ils sont plus répandus dans les arbres phylogénétiques des procaryotes (archées et bactéries) (**Daoud et Ben Ali, 2020**).

Depuis 2018, toutes les espèces halophiles documentées ainsi que leurs informations de base ont été rassemblées dans une base de données en ligne nommée HaloDom, selon laquelle, il existe plus de 1000 espèces halophiles dispersées en 21,9% d'archées, 27,9% d'eucaryotes et 50,1% de bactéries (**Daoud et Ben Ali, 2020**).

2.1/ Domaine des archées

Les archées halophiles sont classées dans deux grandes branches d'*Euryarchaeota* : les *Halobacteriales* et les *Méthanogènes*.

Actuellement, la classe *Halobacteria* est regroupée en six familles et trois ordres, l'ordre des *Halobacteriales*, des *Haloferacales* et des *Natrialbales* (**figure 01**).

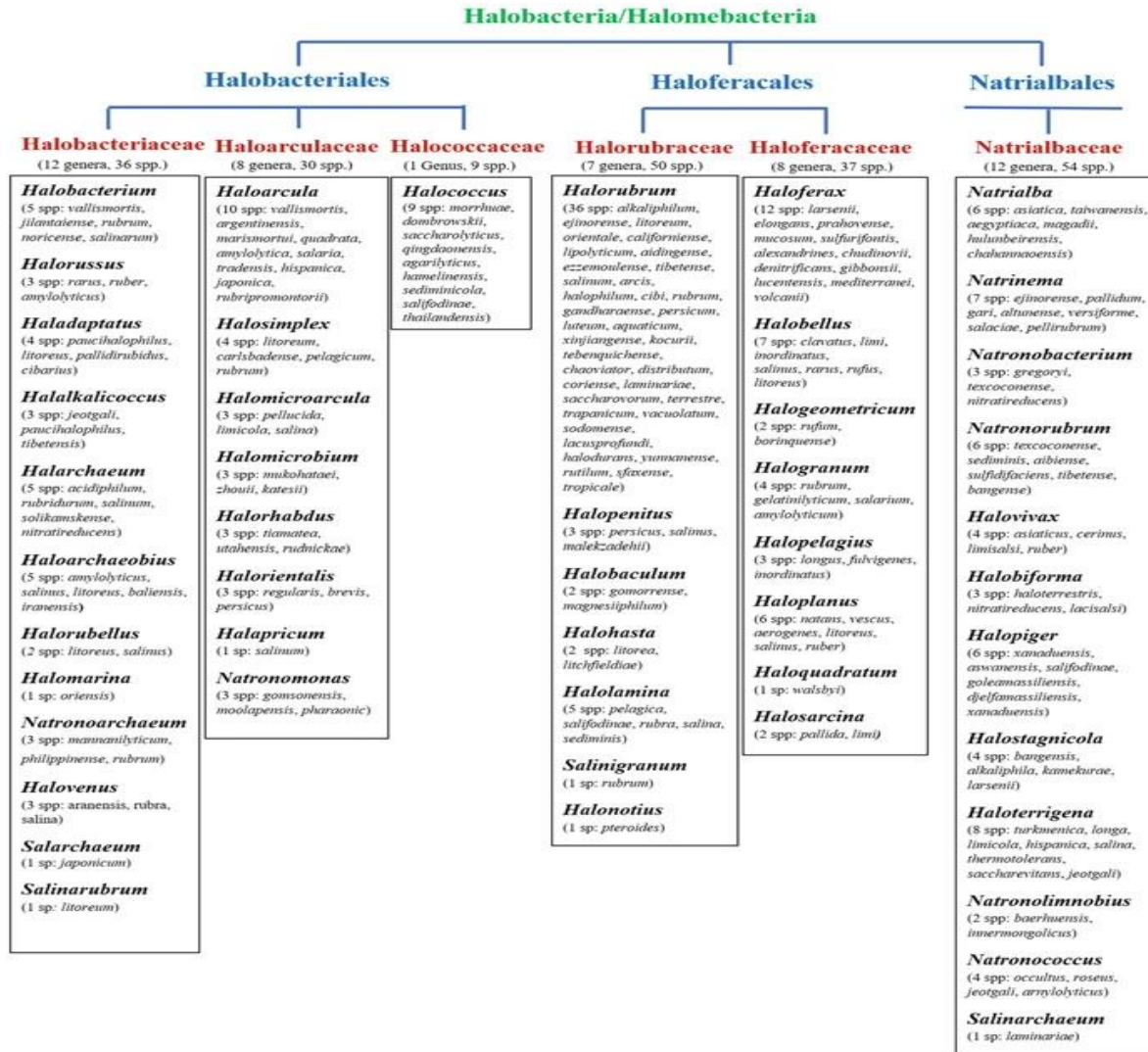


Figure 01 : Classification phylogénétique des archées halophiles appartenant à la classe Halobacteria (Kumar et Tiwari, 2019).

L'ordre des *Halobacteriales* compte actuellement le plus grand nombre d'espèces au sein du groupe, il est divisé en trois familles : *Halobacteriaceae*, *Haloarculaceae* et *Halococcaceae*. La famille des *Halobacteriaceae* est la plus grande famille de la classe *Halobacteria*, dans laquelle on trouve le genre le plus étudié : *Halobacterium* et l'espèce *Halobacterium salinarum* dont le métabolisme nécessite un environnement à forte teneur en sels. La plupart des espèces sont pigmentées en rouge en raison d'une teneur élevée en pigments caroténoïdes C-50 dans

leurs membranes (α -bactériorubérine et dérivés) et qui assurent aux cellules une protection contre les stress photos-oxydatifs, accompagnés dans certains cas d'un pigment rétinien violet appelée la bactériorhodopsine, et une pompe membranaire à protons qui assurent le déplacement de ces protons hors de cellule à travers la membrane tout en capturant l'énergie lumineuse, le gradient de protons résultant est ensuite converti en énergie chimique (**Wu et al., 2022**).

Le second ordre qui contient un grand nombre d'espèces est celui des *Haloferacales*, qui est réparti en deux familles : les *Haloferacaceae* et les *Halorubraceae*, suivi de l'ordre des *Natrialbales*, qui comprend la seule famille des *Natrialbaceae* (**Wu et al., 2022**).

2.2/ Domaine des bactéries

Le domaine Bacteria regroupe la plus grande diversité des halophiles représentée par des espèces halotolérantes et halophiles modérées que des halophiles extrêmes (**Menasria, 2020**). Les bactéries halophiles sont hautement diversifiées en termes d'espèces qui présentent une large gamme d'activités métaboliques. Elles peuvent être soit à Gram positif soit à Gram négatif, phototrophes ou hétérotrophes, et se présentent sous forme de bacilles, de cocci ou de cellules spiralées, allant des aérobies aux strictement anaérobies (**Kothe, 2021**).

La plupart des bactéries halophiles appartiennent aux phylas: *Bacillota* (anciennement *Firmicutes*), *Actinobacteriota* (*Actinobacteria*), *Pseudomonadota* (anciennement *Proteobacteria*), *Fusobacteriota* (anciennement *Fusobacteria*), *Bacteroidota* (anciennement *Bacteroidetes*) et *Spirochaetota* (anciennement *Spirochaetes*) et *Cyanobacteria* (**Leão et al., 2023 ; Sánchez-Porro, 2023**).

2.2.1/ Le phylum Bacillota

Les *Bacillota* (*Firmicutes*) représentent un phylum de bactéries dont la plupart sont à Gram positif, ayant une forme ronde ou en bâtonnet, dans lequel on trouve principalement les genres *Bacillus*, *Clostridium* et *Aquibacillus*, appartenant à la famille des *Bacillaceae*. Les espèces *Aquibacillus shalophilus* et *Aquibacillus sediminis* sont des bactéries modérément halophiles isolées d'environnements hypersalins, elles sont des bâtonnets, à Gram positif, mobiles et strictement aérobies (**Galisteo et al., 2023**).

2.2.2/ Le phylum Actinobacteriota

Le phylum *Actinobacteriota* comprend des bactéries largement étudiées et connues comme de productrices de plusieurs substances bioactives à potentiel biotechnologique, notamment en médecine, ayant des activités antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antivirales, antifongiques, antiallergiques, antibactériennes, antitumorales et cytotoxiques. Ces espèces d'actinobactéries halophiles appartiennent aux plusieurs familles telles que : *Nocardiaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Streptomycetaceae*, *Micromonosporaceae*... etc (Xie et Pathom-aree, 2021).

2.2.3/ Le phylum Pseudomonadota

Les bactéries appartenant au phylum *Pseudomonadota* dominent les milieux naturels qui sont fréquemment soumis à des impacts anthropiques. Ce phylum comprend plusieurs classes comme *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* et *Hydrogenophilalia*, dont plusieurs genres sont pathogènes tels que *Pseudomonas* et *Vibrio* mais aussi des bactéries impliquées dans la fixation biologique d'azote tel le genre *Rhizobium* (Leão et al., 2023).

2.2.4/ Le phylum Fusobacteriota

Actuellement, les Fusobactéries sont divisées en deux familles : Les *Leptotrichiaceae* et les *Fusobacteriaceae*, qui comprennent les genres marins et aquatiques *Psychrilyobacter*, *Ilyobacter*, *Propionigenium* et *Cetobacterium*. Ces bactéries, peu étudiées, sont des anaérobies, à Gram négatif, non sporulées, généralement non mobiles, qui prennent la forme d'un bâtonnet effilé, telles que l'espèce *Psychrilyobacter atlanticus* (Brennan et Garrett, 2019).

2.2.5/ Le phylum Bacteroidota

Les Bacteroidetes sont des bâtonnets chimio-organotrophes, à coloration de Gram négatif, qui ne forment pas d'endospores et sont soit immobiles, soit mobiles par glissement. Le phylum comprend les classes *Bacteroidia*, *Cytophagia* et *Flavobacteria*.

Ces bactéries sont largement répandues dans l'environnement, c'est l'exemple de la famille *Cyclobacteriaceae* qui a été uniquement trouvée dans des environnements hypersalins.

La grande variété d'habitats reflète l'importance des Bacteroidetes dans les processus biogéochimiques et leur spécialisation fonctionnelle dans la décomposition des peptides et des polysaccharides (Hahnke et al., 2016).

2.2.6/ Le phylum Spirochaetota

Dans ce phylum on trouve la famille des *Spirochaetaceae* qui comporte le genre *Spirochaeta* ayant une espèce halophile et anaérobie obligatoire nommée *Spirochaeta sinaica*, qui se présente sous forme d'hélice mobile, a pu se développer à des concentrations de NaCl de 2 à 12 % (croissance optimale à 7 %), à des températures de 10 à 32 °C (optimum à 28 °C) et à un pH de 6 à 8,5 (optimum à pH 7,0 - 7,5) (Dubinina *et al.*, 2015).

2.2.7/ Le phylum Cyanobacteri ou Cyanobacteriota

Les halophiles sont trouvés parmi les cyanobactéries, qui sont des bactéries photosynthétiques halophiles isolées de la surface de sédiments de milieux hypersalés où elles forment des tapis microbiens. Il s'agit surtout de cyanobactéries et de bactéries anoxygéniques pourpres, des genres *Ectothiorhodospira* et *Chromatium* isolés d'un lac hypersalin alcalin situé dans le Nevada (Big Soda lake) (Hernandez-Maldonado *et al.*, 2016).

2.3/ Domaine des Eucaryotes

Bien que les organismes procaryotes soient très majoritaires dans les écosystèmes hypersalés, des microorganismes eucaryotes peuvent être retrouvés dans ces environnements sauf que ces halophiles sont rares (Besse, 2016).

Parmi les champignons filamenteux on trouve les genres *Hortaea*, *Wallemia* et *Aureobasidium* (Wang *et al.*, 2020 ; Plemenitaš, 2021). Quant aux levures, on trouve le genre *Debaryomyces* (Cacciarella, 2021), mais les eucaryotes halophiles les mieux étudiés sont les algues vertes du genre *Dunaliella*, dont certaines sont oranges plutôt que vertes car elles accumulent des quantités massives de β -carotène. *Dunaliella* est d'une grande importance écologique dans les lacs salés et soutient ainsi la vie des communautés hétérotrophes (figure 02) (Pagels et Guedes, 2023).



Figure 02 : Exemple d'une algue halophile : *Dunaliella salina*.

https://121clicks.com/wp-content/uploads/2021/08/dunaliella_salina_paolo_pettigiani_01.jpg

3/ Facteurs physico-chimiques affectant la croissance des microorganismes halophiles

Les environnements hypersalins ne sont pas caractérisés uniquement par une teneur élevée en sel mais aussi d'autres extrêmes conditions physico-chimiques environnementales comme la haute pression, la haute température, les pH extrêmes, les concentrations élevées de composés toxiques et de métaux lourds, la faible disponibilité d'oxygène, le rayonnement UV et la haute intensité lumineuse...etc. (Salma, 2020 ; Cui et Dyll-Smith, 2021 ; Lach *et al.*, 2021).

3.1/ pH

La plupart des microorganismes halophiles et halotolérants sont neutrophiles et alcaliphiles. Les neutrophiles croissent mieux à des pH de 6,8 à 7,5 tandis que les alcaliphiles croissent à des pH de 8 à 10 en utilisant des carbonates pour maintenir le pH (Al-Rubaye *et al.*, 2017).

3.2/ Température

La plupart des microorganismes halophiles et halotolérants croissent de manière optimale à une température ambiante et légèrement au-dessus, soit entre 30 C° et 37°C, ce qui signifie qu'ils sont mésophiles. Cependant, il existe également quelques halophiles capables de tolérer des températures aussi élevées que 50C° à 60°C et aussi basses que 0C° à 11°C. Certains peuvent même croître à des températures égales ou inférieures à - 5°C en présence de salinités élevées (Detay et Thomas, 2018).

3.3/ Salinité

La concentration de sel détermine la distribution des halophiles. De nombreux haloarchées croissent à une concentration de NaCl égale ou supérieure à 15-18 %. À une concentration de moins de 5 à 12 % de NaCl, leurs cellules sont endommagées et lysées. La plupart des bactéries halophiles sont des halophiles modérées et croissent à une concentration de 3 à 15 % de NaCl (Kumar et Tiwari, 2019).

3.4/ Oxygène

Les systèmes hypersalés sont des environnements anoxiques en dehors de la surface des eaux, car les températures élevées et les fortes salinités limitent la solubilisation de l'oxygène et engendrent des zones favorables à la prolifération d'une flore anaérobie (Pimbert, 2016).

Paradoxalement, l'aérobiose est assez largement représentée à la surface de ces environnements, aussi l'agitation des eaux de surfaces par le vent permet l'aération et donc la disponibilité d'oxygène pour les microorganismes aérobies (Buhungu *et al.*, 2018).

4/ Mécanismes d'adaptation des microorganismes halophiles

La survie des micro-organismes dans un environnement salin nécessite que les cellules maintiennent leur pression osmotique intracellulaire, qui doit être au moins isosmotique ou hyperosmotique, et empêchent la perte de l'eau à travers les membranes perméables (Verma *et al.*, 2020). Pour s'adapter à des conditions de salinité aussi difficiles, les micro-organismes halophiles et halotolérants utilisent deux stratégies différentes appelées : **high-salt-in** et **low-salt-in**.

4.1/ La stratégie "high-salt-in"

L'accumulation d'ions inorganique dans le cytoplasme cellulaire permet de maintenir des concentrations salines intracellulaires extrêmement élevées (Trung, 2020). Elle concerne spécifiquement les bactéries aérobies du genre *Salinibacter* et les bactéries anaérobies de l'ordre des *Halanaerobiales* et également des archées aérobies (Hamad *et al.*, 2021). Dans la plupart des cas l'ion K^+ et l'ion Cl^- sont respectivement les ions majoritairement accumulés (Verma *et al.*, 2020). La régulation de la concentration en ions est possible grâce à l'action coopérative de plusieurs protéines de transport « pompes ioniques (Na^+/H^+) », transporteurs couplés (acide aminé/ Na^+), uniport (K^+) ...etc (figure 03) (Verma *et al.*, 2020).

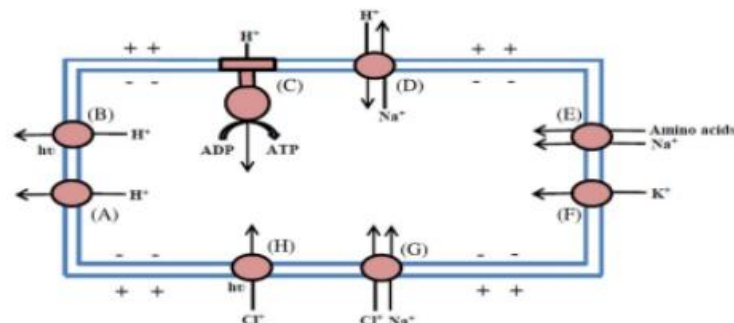


Figure 03 : la stratégie high-salt-in exercée à travers la membrane cellulaire d'une bactérie halophile (Verma *et al.*, 2020).

4.2/ La stratégie “low-salt-in”

Ce mécanisme d'adaptation est principalement maintenu par les solutés organiques ou osmolytes, qui sont principalement produits soit par synthèse endogène soit par import à partir du milieu extracellulaire. Ces solutés sont des molécules organiques, polaires, de faible poids moléculaire, hautement solubles dans l'eau à de fortes concentrations et dont la plupart ne possèdent pas de charges nettes (zwitterions ou composés non chargés neutres). La plupart des cellules utilisent différents solutés plutôt qu'un système basé sur un seul soluté organique (acides aminés, sucre, polyols) (**tableau 01**). L'accumulation des solutés compatibles n'empêche pas la conservation d'une faible concentration ionique intracellulaire d'ions K^+ et Cl^- grâce au transport actif (Verma *et al.*, 2020).

Tableau 01 : Exemples de solutés organiques zwitterioniques synthétisés par des procaryotes (Verma *et al.*, 2020).

Solutés	Espèces productrices
Glycine-bétaïne	<i>Halorhodospira halochloris</i> , <i>Methylophaga terricola</i> , <i>Methylophaga</i> sp., <i>Sporosarcina pasteurii</i> , <i>Brevibacterium</i> sp., <i>Chromohalobacter</i> sp.
Éctoïne	<i>Vibrio cholera</i> , <i>Halorhodospira halochloris</i> , <i>Halomonas elongata</i> , <i>H. variabilis</i> , <i>Chromohalobacter salexigens</i> , <i>C. israelensis</i> , <i>Methylophaga alcalica</i> , <i>Halobacillus halophilus</i> , <i>Micrococcus</i> sp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Rhodovulum sulfidophilum</i> , <i>Brevibacterium</i> sp.
Hydroxy -éctoïne	<i>Halomonas elongata</i> , <i>Nocardiopsis halophila</i> , <i>Sporosarcina</i> sp.
β -glutamine	<i>Methanohalophilus portucalensis</i> , <i>Methanosarcina thermophila</i> , <i>Methanothermus thermolithotropicus</i> .

5/ Intérêts biotechnologiques des microorganismes halophiles

5.1/ Applications de la bactérie halophile

5.1.1/ Domaine agroalimentaire

Les bactéries halophiles sont couramment utilisées pour atténuer le stress salin et améliorer la croissance des plantes. Ces bactéries halotolérantes à potentiel agronomique sont utilisées dans le

contrôle biologique des phytopathogènes, la production de biostimulants et la fabrication de biofertilisants (**Dutta et Bandopadhyay, 2022**).

Elles sont également utilisées en industrie alimentaire, notamment dans la préparation d'une sauce à base de soja ou d'une sauce à base de poisson appelée "nuoc mam" (**Anwar et al., 2020**).

5.1.2/ Clonage moléculaire

Dans le cadre de la biologie moderne, il est concevable de réaliser des transferts génétiques permettant de donner des capacités de résistance au sel et à la sécheresse à des céréales comme le blé, le riz ou l'orge, tenant compte de l'information génétique générée par le séquençage de génomes de bactéries halophiles, c'est l'exemple de la souche *Halobacillus trueperi* SS1, une bactérie halophile extrême qui a été exploitée pour isoler et cloner des gènes de tolérance au sel (**Gupta et al., 2020**).

2.1.3/ Biorémédiation

Les environnements salins et hypersalins sont fréquemment contaminés par des composés organiques en raison d'activités industrielles, où le niveau de la toxicité est élevé (**Lefebvre, 2020**). Une alternative pour surmonter ce problème est l'utilisation de bactéries halophiles adaptées à ces conditions. Plusieurs études ont montré la dégradation bactérienne de composés aromatiques en conditions salines en utilisant des genres de bactéries halophiles tels *Halomonas* sp (**Monzón, 2018**). Des archées halophiles appartenant au genre *Halobacterium* sont capables de métaboliser des hydrocarbures (**Besse, 2016**). Récemment, une souche archéenne halophile *Haloarcula* sp s'est montrée capable de se développer en conditions aérobies sur l'acide 4-hydroxybenzoïque comme source unique de carbone et d'énergie (**Tsagogiannis et al., 2024**). D'autres espèces halophiles telles que *Dietzia maris* et *Halomonas eurihalina* ont été reportées comme capables de dégrader des hydrocarbures et quelques composants de pétrole brut (**Venilet al., 2021**).

5.2/ Application des métabolites produits par la bactérie halophile

5.2.1/ Enzymes

Les enzymes halophiles sont utiles dans de nombreux domaines tels que l'industrie alimentaire, les détergents à lessive et les industries textiles en raison de leur stabilité et de leur

polyextrémophilie, ce qui leur permet de fonctionner mieux dans des environnements extrêmes de haute salinité. Ces enzymes sont utilisées également dans le domaine alimentaire, de la production d'énergie et dans la détoxification des pesticides...etc (**tableau 02**) (**Vigneshwar et al., 2023**).

Tableau 02 : Exemples d'enzymes produites par les microorganismes halophiles et leurs applications en biotechnologie (Vigneshwar et al., 2023).

Microorganismes	Enzymes	Application
<i>Halobacterium</i> sp <i>Halococcus agarilyticus</i>	Protéase	Traitement du cuir, alimentaire, produits laitiers
<i>Gracilibacillus</i> sp	Xylanase	Industrie papetière.
<i>Haloferax mediterranei</i>	Lipase	Détergent, pharmaceutique.
<i>Bacillus</i> sp	Amylase	Industrie brassicole, alimentaire.
<i>Marinobacter</i>	L-arginase	Synthèse d'aromes

5.2.2/ Solutés compatibles

Quelques composés comme la glycine, la bétaïne et l'éctoïne porte un grand intérêt notamment dans les industries pharmaceutique et cosmétique dû à leur potentiel protecteur protégeant la peau contre les radiations UV (**Jadhav et al., 2018**).

5.2.3/ Pigments caroténoïdes

La couleur observée dans les environnements hypersalins et synthétisée par des microorganismes halophiles notamment *Dunaliella* et *Salinibacter ruber*, s'appelle la salinixanthine. Ce pigment est utilisé comme antioxydant, colorant alimentaire et source de provitamine A (**Sricharoen et al., 2023**).

5.2.4/ Exo-polysaccharides

Ces composés sont utilisés dans plusieurs domaines :

- **Environnementale** : dans la détoxification des métaux et représentent donc une méthode de dépollution biologique à faible coût.
- **Alimentaire** : comme agents gélifiants ou émulsifiants.
- **Clinique** : grâce à leurs immunostimulantes, antitumorales, anti-inflammatoires.

- **Cosmétique** : comme molécules antiâge (agent hydratant, raffermisssement de la peau, lissant, antirides, de réparation cellulaire, de régénération de cellules dermique et de protection contre les UV) (**Biswas et Paul, 2017**).

Partie II :
Matériel et méthodes

1/ Provenance des bactéries halophiles

Les souches bactériennes halophiles étudiées, au nombre de six ont été fournies par notre encadrante M^{me} MERIANE Ilhem. Chacune avait un code spécifique : **S1, S2, S5, S10, S13, S18**.

2/ Revivification des bactéries halophiles

Deux milieux de culture appelés M1 et M3 (**Sanogo, 2023**) ont été préparés dans le but de revivifier les bactéries halophiles (leur composition est mentionnée en annexe) (**figure 04**).

À partir des tubes Eppendorf et en utilisant une pipette Pasteur stérile, une goutte de milieu de culture liquide contenant l'inoculum a été prélevé puis étalé sur le milieu de culture solide de la revivification par la méthode de stries à l'aide d'une anse de platine préalablement stérilisée à la flamme du bec Bunsen.

Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 C° pendant 15 jours.

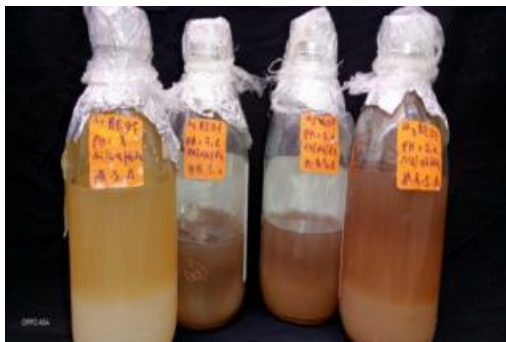


Figure 04. Photographie des milieux de culture utilisés pour la revivification.
(De gauche à droite : M1 (2 flacons) et M3 (2 flacons)).

3/ Repiquage et purification

Dans des conditions stériles, une colonie bien isolée et représentative de chaque souche destinée à être repiquée a été prélevée à aide d'une anse de platine stérile et étalée en stries sur une nouvelle boîte de Pétri contenant les milieux de culture M1 et M3. Ces boîtes de Pétri ont

été incubées à 37 C°. La pureté des colonies développées a été vérifiée par l'étude de leurs caractères macroscopiques et microscopique (**Sanogo, 2023**).

4/ Étude des caractères physico-chimiques des bactéries halophiles

4-1/ Effet de différents pH sur la croissance des bactéries halophiles

Les six souches bactériennes ont étéensemencées sur les milieux M1 et M3 préalablement préparés puis ajustées à différentes valeurs de pH (**annexe**). Les milieux de culture ont été liquides (préparés dans des tubes à essai) pour le pH 5 et le pH6, et solides (préparés puis coulés dans des boîtes de Pétri) pour le pH 8, 9 et 10 (**figure 05**).

À l'aide d'une anse de platine préalablement stérilisée à la flamme du bec Bunsen, une colonie bien isolée a été prélevée puis introduite dans des tubes contenant le milieu de culture liquide puis ce dernier a été homogénéisé en utilisant l'agitateur Vortex. La méthode des stries a été réalisée sur les milieux de culture solide en prélevant à l'aide d'une anse de platine préalablement stérilisée à la flamme du bec Bunsen, un fragment de colonie pure, qui a été étalé prudemment sur toute la surface de milieu de culture.

Des témoins négatifs ont été préparés et incubés dans les mêmes conditions.

La lecture s'est réalisée à partir de 24h jusqu'à 10 jours successives d'incubation à 37C°.

Toute croissance a signifié un résultat positif, symbolisée par un (+).

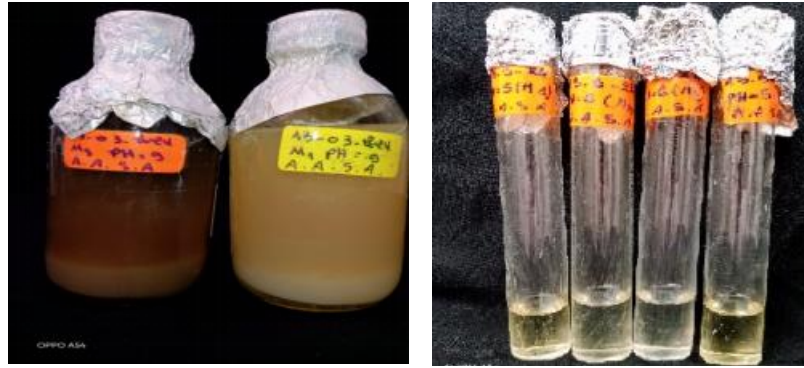
Les résultats positifs obtenus ont été traduits comme suit :

(+) : présence de quelques colonies.

(++) : croissance faible.

(+++): croissance modérée.

(++++): très bonne croissance (envahissement de la boîte de Pétri).



(A)

(B)

Figure 05. Photographies des milieux de culture liquides et solides utilisés pour l'étude du paramètre pH.

(A) : M1, pH 9, (gauche) et M3, pH 9 (droite), (B) : M1, pH 5 et 6 (gauche) et M3, pH 5 et 6(droite).

4-2/ Effet de différentes concentrations en NaCl sur la croissance des bactéries halophiles

La croissance des souches bactériennes en présence de différentes concentrations en NaCl a été mise en évidence sur un milieu de culture solide ensemencé par la méthode des stries. Il s'agit également des milieux M1 et M3 préparés avec 0%, 0.5%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% et 30% de NaCl (annexe) (**figure 06**).

Un témoin négatif pour a été préparé chaque milieu de culture.

L'incubation s'est réalisée à 37 C°, avec une lecture régulière effectuée à partir de 24h pendant 10 jours successivement.

Un résultat positif se traduit par une croissance bactérienne, où :

(+) : présence de quelques colonies.

(++) : croissance faible.

(+++): croissance modérée.

(++++): très bonne croissance (envahissement de la boîte de Pétri).



Figure 06. Photographie des milieux de culture utilisés pour l'étude du paramètre NaCl.
(À droite : M1 à 25% de NaCl, au centre : M3 à 0.5% de NaCl et à gauche : M3 à 10% de NaCl).

4-3/Effet de différentes températures sur la croissance des bactéries halophiles

Les souches bactériennes halophiles ont été ensemencées sur les milieux **M1** et **M3** (**figure 07**), coulés en boîtes de Pétri en utilisant la méthode des stries, puis incubées à différentes températures : 4°C, 10°C, 20°C, 37°C, 40°C, 50°C et 60°C.

Un témoin négatif a été préparé pour chaque milieu de culture.

La lecture a été effectuée quotidiennement pendant 10 jours.

Un résultat positif se traduit par une croissance bactérienne, où :

(+) : présence de quelques colonies.

(++) : croissance faible.

(+++): croissance modérée.

(++++): très bonne croissance (envahissement de la boîte de Pétri).



Figure 07. Photographie des milieux de culture utilisés pour l'étude du paramètre température.
(À droite : M3 pour T : 4°C, au centre : M1 pour T: 40°C et à gauche : M3 pour T: 50°C).

5/ Étude enzymatique : recherche de la L-arginase et de la L-méthionase

Les tests enzymatiques sont principalement réalisés afin de détecter la présence d'une enzyme donnée (Hassabo *et al.*, 2022).

Deux enzymes : **la L-arginase** et **la L-méthionase** ont été recherchées. Pour cela, 1% de deux substrats **L-arginine** et **L-méthionine** ont été ajoutés aux milieux de culture de base (**annexe**), dans lesquels le rouge de phénol a été utilisé comme un indicateur coloré de pH (**figure 08**).

Un témoin négatif pour chaque milieu de culture a été préparé.

L'ensemencement s'est réalisé par une strie longitudinale au centre de milieu de culture contenue dans la boîte de Pétri. L'incubation a été effectuée à 37C°.

Un résultat positif traduit par un virage de couleur d'orange vers le violet, où :

(+) : couleur observée au niveau de strie.

(++) : couleur observée au-delà de la strie.

(+++): Un virage total de la couleur au niveau de toute la boîte de Pétri.

En fait, en cas de l'hydrolyse de l'arginine par l'arginase, l'urée et l'ornithine se forment. Ensuite, la dégradation de l'urée et la libération de l'ammoniac alcalinise fortement le milieu par un virage de couleur au rose fuchsia ou violet. En cas de l'hydrolyse de la L-méthionine par la L-méthioninase, la kétobutyrate, méthanthiol et l'ammoniac se forment. Ce dernier est le responsable de l'alcalinisation du milieu et puis après le virage de la couleur du milieu de culture de l'orange au violet (Hassabo *et al.*, 2022).

Dans le cas d'absence du virage, le résultat est considéré comme négatif.



Figure 08. Photographie des milieux de culture utilisés pour l'étude des tests enzymatiques. (À droite : M3 additionné de la L-arginine et à gauche : M3 additionné de la L-méthionine).

Partie III :

Résultats et discussion

1/ Revivification, repiquage et purification

Après 15 jours d'incubation, toutes les souches se sont développées dont leur développement a été marqué par une vitesse et un taux de croissance différents.

Les colonies repiquées ont été obtenues après 24h à 3 jours d'incubation à 37°C. Elles ont été pures et compatibles avec les colonies précédemment obtenues (Sanogo, 2023).

Les photos ci-dessous montrent les résultats du repiquage et de la purification de quelques souches (figure 08).

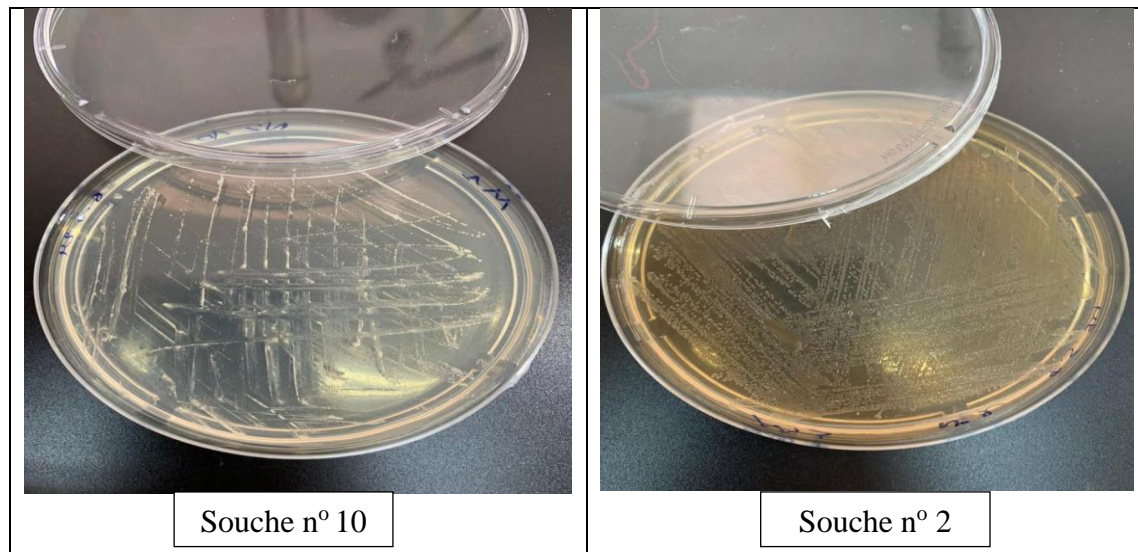


Figure 09 : Photographies de deux souches halophiles : 2 et 10, après repiquage et purification (après 48h d'incubation).

2/ Étude des caractères physico-chimiques des bactéries halophiles

2.1/ Étude de l'effet de différents caractères physico-chimiques sur la croissance de la totalité des bactéries halophiles étudiées

2.1.1/ Effet du pH sur la croissance des bactéries halophiles

Les résultats de l'effet de différents pH sur la croissance des six bactéries halophiles sont démontrés dans le tableau n° 3 et la figure n°10

Tableau 03 : Les résultats de l'étude de l'effet du paramètre de pH sur la croissance des bactéries halophiles après 10 jours d'incubation.

pH	Souches						Pourcentage de la croissance (%)	
	1	2	5	10	13	18	Positive	Négative
5	+	-	-	+	-	-	33	67
6	+	-	-	+	+	-	50	50
7	+	+	+	+	+	+	100	0
8	+	+	+	+	+	+	100	0
9	+	+	+	-	+	+	83	17
10	+	+	+	-	+	+	83	17

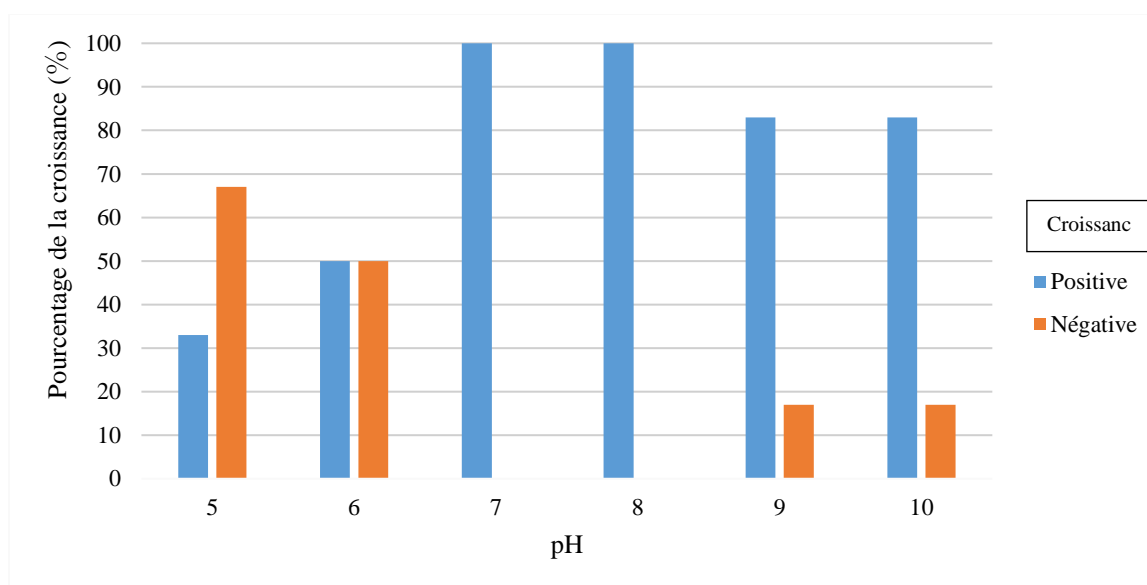


Figure 10 : Les résultats de l'étude de l'effet du paramètre de pH sur la croissance des bactéries halophiles après 10 jours d'incubation.

D'après ces résultats, on remarque que toutes les souches ont pu développer à pH 7 et à pH 8 (100%). Leur majorité ont pu croître à pH 9 et 10 (83%). Aux pH acides, la croissance a remarquablement diminué pour atteindre 50% à pH 6 et 33% à pH 5.

2.1.2/ Effet de la concentration en NaCl sur la croissance des bactéries halophiles

Les résultats de l'effet de différentes concentrations de NaCl sur la croissance des six bactéries halophiles sont mentionnés dans le tableau n° 4 et le figure n°11 :

Tableau 04 : Les résultats de l'étude de l'effet du paramètre de NaCl sur la croissance des bactéries halophiles après 10 jours d'incubation.

NaCl (%)	Souches						Pourcentage de la croissance (%)	
	1	2	5	10	13	18	Positive	Négative
0	+	-	-	+	-	+	50	50
0,5	+	-	+	+	-	+	67	33
3	+	+	+	+	-	+	83	17
5	+	+	+	+	-	-	67	17
10	-	+	+	+	+	-	67	33
15	-	+	+	+	+	-	67	33
20	-	+	+	+	-	-	50	50
25	-	-	-	-	-	-	0	100

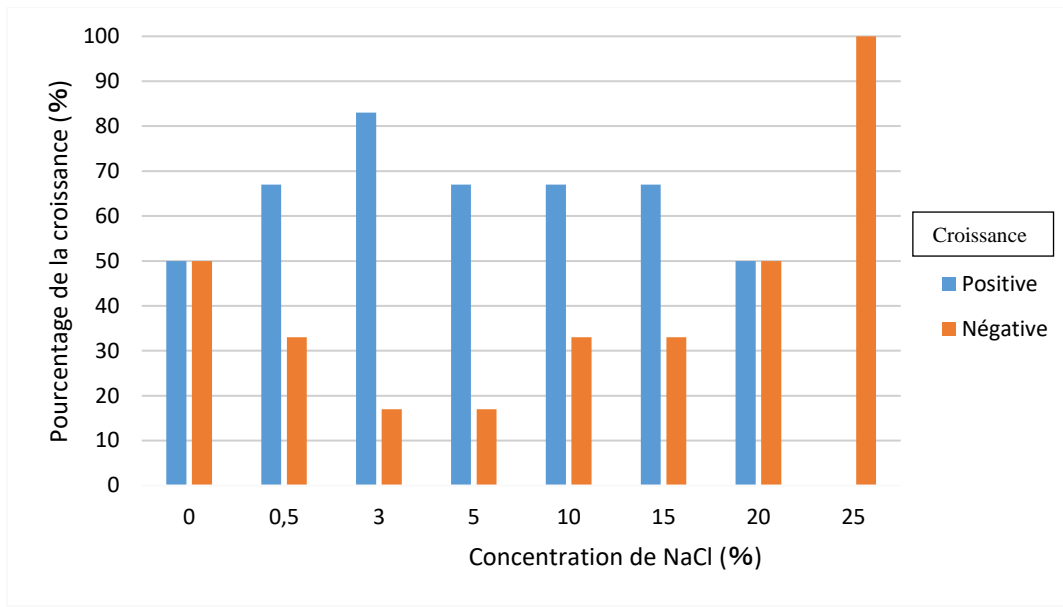


Figure 11 : Les résultats de l'étude de l'effet du paramètre de NaCl sur la croissance des bactéries halophiles après 10 jours d'incubation.

D'après ces résultats, on remarque que la majorité des souches bactériennes halophiles (83%) ont pu croître à une concentration de NaCl de 3%. 67% des souches ont montré une croissance à des concentrations de 0.5%, 5%, 10% et 15% de NaCl. La moitié des souches (3) ont pu se développer dans le milieu préparé sans NaCl et le milieu préparé avec une concentration de NaCl de 20%. Finalement, aucune souche n'a pu développer à une concentration de 25% de NaCl.

2.1.3/ Effet de la température sur la croissance des bactéries halophiles

Les résultats de l'effet de différentes températures sur la croissance des six bactéries halophiles sont démontrés dans le tableau n°5 et la figure n° 12.

Tableau 05 : Les résultats de l'étude de l'effet de la température sur la croissance des bactéries halophiles après 10 jours d'incubation.

Température (°C)	Souches						Pourcentage de la croissance (%)	
	1	2	5	10	13	18	Positive	Négative
4	-	-	-	-	-	+	17	83
10	-	+	-	-	-	+	33	67
20	-	+	-	-	-	+	33	67
37	+	+	+	+	+	+	100	0
40	+	+	+	+	+	+	100	0
50	-	-	-	+	-	-	17	83
60	-	-	-	-	-	-	0	100

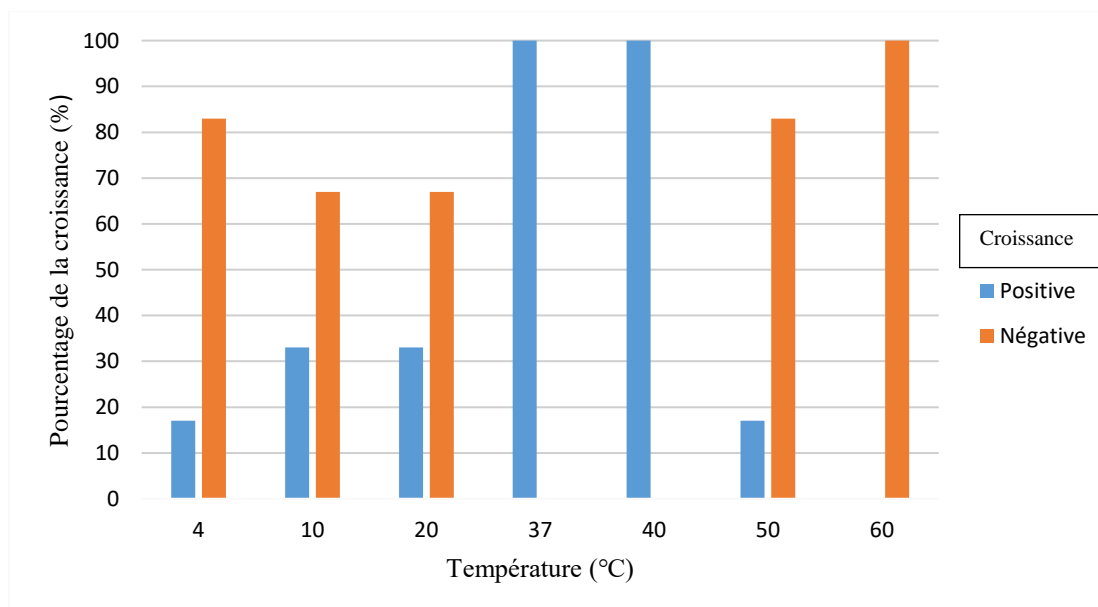


Figure 12 : Les résultats de l'étude de l'effet de la température sur la croissance des bactéries halophiles après 10 jours d'incubation.

D'après ces résultats, on remarque que toutes les souches ont pu développer aux températures de 40°C et 37°C (100%). 33% ont pu croître aux températures de 10°C et de 20°C. Aux températures extrêmes, la croissance a remarquablement diminué : 17% ont pu développer aux températures de 4°C et de 50°C et aucune croissance n'a été observée à la température de 60°C.

2.2/ Étude de l'effet de différents caractères physico-chimiques sur la croissance de chaque souche halophile étudiée

2.2.1/ Étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de la souche n°1

Les résultats de l'étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de la souche n°1 sont mentionnés dans le tableau n°6.

Tableau 06 : Les résultats de l'étude de différents paramètres physico-chimiques sur la croissance de souche n°1 après 10 jours d'incubation.

Souche n° 1										
pH	Temps d'incubation (jours)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7	+	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
8	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++
9	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
NaCl (%)										
0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0,5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
3	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Température (°C)										
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	+	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
40	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Concernant le pH, la croissance de la souche n°1 a été lente pour la majorité des pH testés. Aux pH 5 et 6, les colonies sont apparues après 10 jours d'incubation. À pH 7, les colonies se sont apparues après 24h d'incubation. Aux pH 8, 9 et 10, l'apparition de quelque colonie a été constatée après le 7^{ème} jour d'incubation (pH 8) et après le 8^{ème} jour d'incubation (pH 9 et 10). Ce qui nous permet de classer la souche comme **neutrophile et alcalitolerante**.

Concernant le NaCl, la croissance de la souche a été extrêmement rapide et excellente dans le milieu M3 préparé sans NaCl (0%), et aussi à une concentration de 0,5%, 3% et 5%. Au-delà de 5%, la souche n'a pas pu se développer. Ceci nous permet de classer la souche comme **halotolerante et légèrement halophile**.

Concernant la température, la souche ne s'est développée qu'aux températures 37°C (après 24h) et 40°C (après le 8^{ème} jour d'incubation). Ce qui nous permet de classer la souche comme **mésophile**.

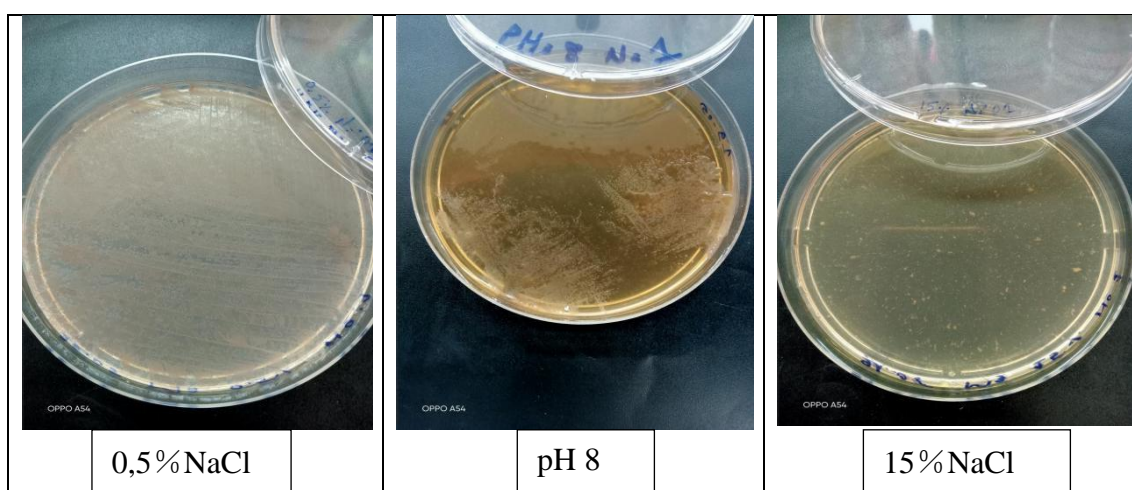


Figure 13 : Photographies de résultats de la croissance de la souche n°1 aux 0,5% et 15% de NaCl après 7 jours d'incubation, et à pH 8 après 10 jours d'incubation.

2.2.2/ Étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de souche n°2

Les résultats de l'étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de la souche n°2 sont mentionnés dans le tableau n°7.

Tableau 07 : Les résultats de l'étude de différents paramètres physico-chimiques sur la croissance de souche n°2 après 10 jours d'incubation.

Souche n° 2										
pH	Temps d'incubation (jours)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
8	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
9	-	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
10	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++
NaCl (%)										
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
5	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
10	-	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
15	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++
20	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Température (°C)										
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
40	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++++
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Concernant le pH, la croissance de la souche n°2 a été rapide à pH 7 (24h d'incubation). Aux pH 8, 9 et 10, les colonies sont apparues après 48h d'incubation. Aux pH 5 et 6, la souche n'a pas pu se développer. Ce qui nous permet de classer la souche comme **neutrophile et alcalitolerante**.

Concernant le NaCl, la croissance de la souche a été rapide dans le milieu M3 préparé avec les concentrations 3%, 5% et 10% de NaCl. Aux concentrations de 15% et 20% de NaCl, les colonies sont apparues après 5 jours d'incubation. Aux concentrations de 0%, 0,5% et 25% de NaCl, la souche n'a pas pu se développer. Ceci nous permet de classer la souche comme **légèrement halophile et halophile modérée**.

Concernant la température, la croissance de la souche a été excellente aux températures 37°C (après 24h) et 40°C (après 3 jours). Aux températures 10°C et 20°C, l'apparition de quelques colonies a été constatée après 48h d'incubation. Au

delà de 40°C, la souche n'a pas pu croître. Ce qui nous permet de classer la souche comme **psychrotolérante et mésophile**.

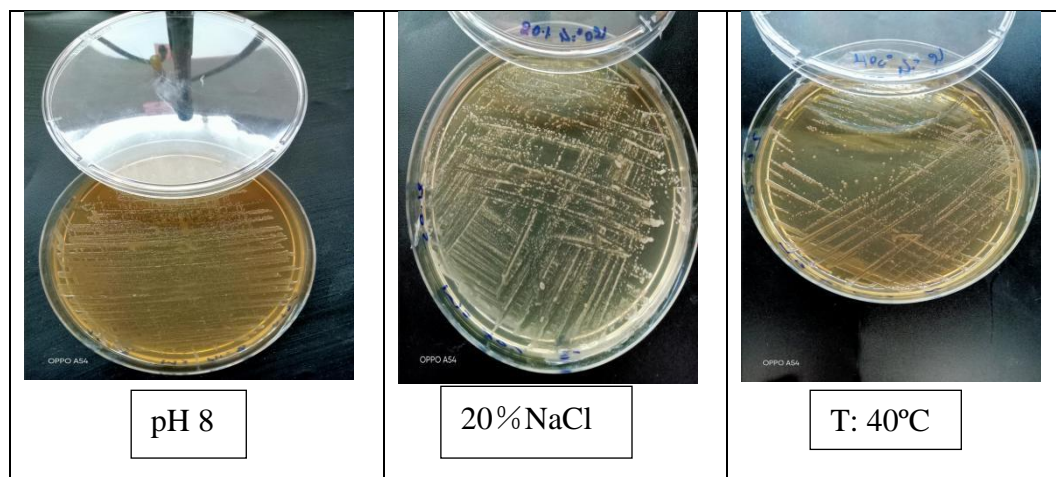


Figure 14 : Photographies de la croissance de la souche n°2 aux pH 8 (après 3 jours), 20%NaCl (après 7 jours d'incubation), et 40°C (après 10 jours d'incubation).

2.2.3/ Étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de souche n°5

Les résultats de l'étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de la souche n°5 sont mentionnés dans le tableau n°8.

Concernant le pH, la croissance de la souche n°5 a été très rapide et bonne à pH 7 (24h). Sa croissance a été lente aux pH alcalins : après la 7^{ème} jours d'incubation au pH 8 et le 9^{ème} jours d'incubation aux pH 9 et 10. Aucune croissance n'a été constatée aux pH acides (5 et 6). Ce qui nous permet de classer comme neutrophile

Concernant le NaCl, la croissance de la souche a été rapide et excellente dans le milieu M3 préparé à une concentration de 10%NaCl (48h d'incubation). Aux concentrations de 0,5%, 3%, 5% et 15%de NaCl, la croissance faible a été observée après 6 jours d'incubation. À 20%de NaCl, la croissance a été excellente (constatée après 6 jours d'incubation). Ceci nous permet de classer la souche comme **halophile modérée et halophile extrême**.

Tableau 08 : Les résultats de l'étude de différents paramètres physico-chimiques sur la croissance de souche n°5 après 10 jours d'incubation.

Souche n° 5										
pH	Temps d'incubation (jours)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
8	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++
9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
NaCl (%)										
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
3	-	-	+	+	+	++	++	++	++	++
5	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
10	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
15	-	-	-	-	-	++	++	++	++	+++
20	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Température (°C)										
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	+	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
40	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Concernant la température, la souche ne s'est développée qu'aux températures 37°C (après 24h) et 40°C (après 48h d'incubation). Ce qui nous permet de classer la souche comme **mésophile**.

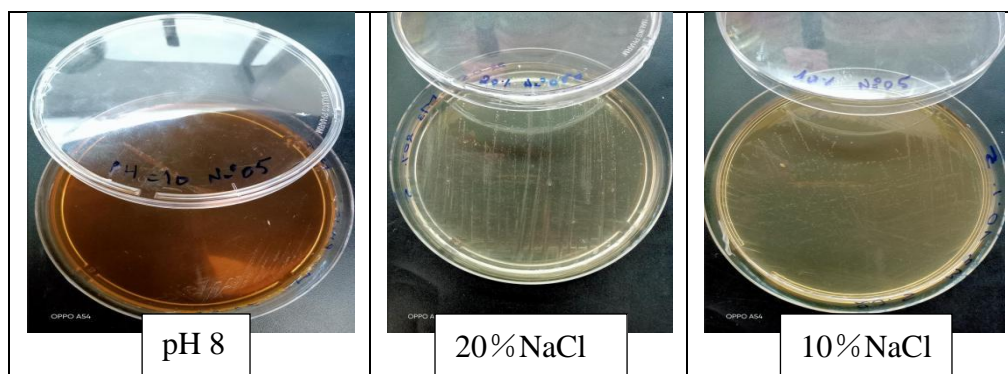


Figure 15 : Photographies de la croissance de la souche n°5 aux pH 8, 20%NaCl et 10%NaCl après 7 jours d'incubation.

2.2.4/ Étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de souche n°10

Les résultats de l'étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de la souche n°10 sont mentionnés dans le tableau n°9.

Tableau 09 : Les résultats de l'étude de différents paramètres physico-chimiques sur la croissance de souche n° 10 après 10 jours d'incubation.

Souche n° 10										
pH	Temps d'incubation (jours)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	-	+	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
8	-	-	-	+	+	+	+	+++	+++	++++
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl(%)										
0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0,5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
3	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
10	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
15	-	-	+	+	++	++++	++++	++++	++++	++++
20	-	-	-	-	-	-	+++	+++	++++	++++
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Température (°C)										
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	+	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
40	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
50	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Concernant le pH, la croissance de la souche n°10 a été observée après 24h d'incubation aux pH acides (pH 5 et 6). À pH 7, la croissance a été bonne après le 4^{ème} jour d'incubation. Aux pH alcalins, la croissance a été faible (pH 8) ou absente (pH 9 et 10). Ce qui nous permet de classer la souche comme **acidophile et neutrophile**.

Concernant le NaCl, la croissance de la souche a été extrêmement rapide et excellente dans le milieu M3 préparé sans NaCl (0%), et aussi aux concentrations de 0,5%, 3%, 5% et 10% de NaCl. Aux concentrations de 15% et 20% de NaCl, la croissance a été excellente après le 6^{ème} jours d'incubation et le 9^{ème} jours d'incubation consécutivement. Finalement aucune souche n'a pu développer à une concentration de 25%. Ceci nous permet de classer la souche comme **halotolérante et halophile légère à modérée**.

Concernant la température, la souche ne s'est développée qu'aux températures 37°C et 50°C (après 24h jour d'incubation) et à 40 (après 5 jours d'incubation). Ce qui nous permet de classer la souche comme **mésophile et thermotolérante**

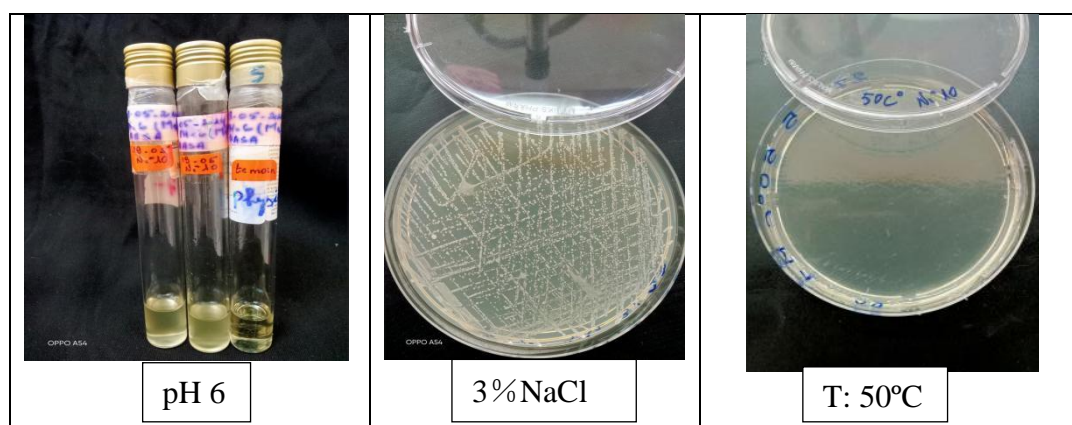


Figure 16 : Photographies de la croissance de la souche n°10 aux pH 6 (après 3 jours d'incubation), 3%NaCl, 50°C (après 10 jours d'incubation).

2.2.5/ Étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de souche n°13

Les résultats de l'étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de la souche n°13 sont mentionnés dans le tableau n°10.

Tableau 10 : Les résultats de l'étude de différents paramètres physico-chimiques sur la croissance de souche n° 13 après 10 jours d'incubation.

Souche n° 13										
pH	Temps d'incubation (jours)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
7	-	-	+	+	++	++	+++	+++	++++	++++
8	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++
9	+	+	+	+	+	+	++	++	+++	++++
10	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+++
NaCl (%)										
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
15	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
20	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Température (°C)										
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	+	+	++	++	+++	+++	++++	++++
40	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Concernant le pH, aucune croissance de la souche n'a été constatée aux pH acides (5 et 6). À pH 7, la croissance a été bonne (observée d'après le 3^{ème} jour d'incubation). Aux pH alcalins, les colonies sont apparues après 24h (pH 9 et 10) et 7^{ème} jour d'incubation (pH 8). Ce qui nous permet de classer la souche comme **neutrophile et alkaliphile**.

Concernant le NaCl, la souche ne s'est développée qu'aux concentrations de 10% et 15% NaCl (après 7 jours d'incubation) et 20% NaCl (après 8 jours d'incubation). Aux

concentrations de 0%, 0,5%, 3% et 5%NaCl, la souche n'a pas pu se développer. Ceci nous permet de classer la souche comme **halophile modérée**.

Concernant la température, la souche ne s'est développée qu'aux températures 37°C (après 3 jours) et 40°C (après le 8^{ème} jour d'incubation). Elle a été bonne à 37°C, ce qui nous permet de classer la souche comme **mésophile**

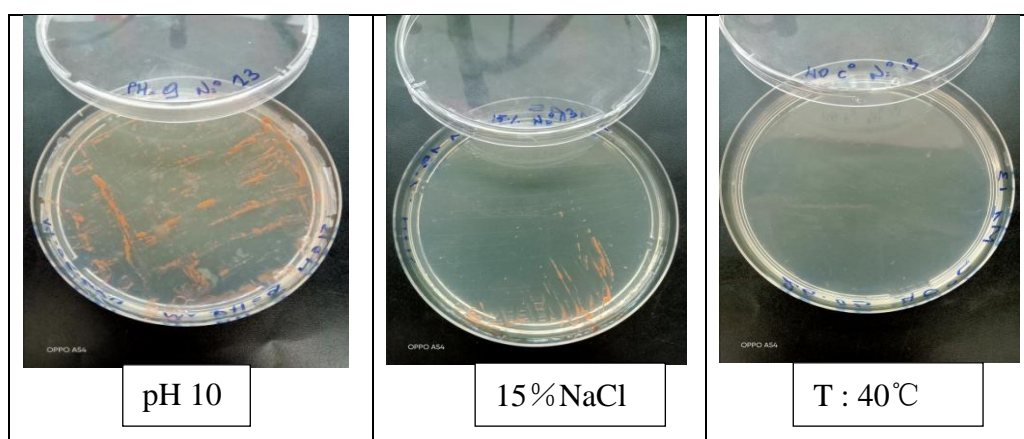


Figure 17 : Photographies de la croissance de la souche n°13 aux pH 10 et 15% NaCl (après 10 jours), et 40°C (après 7 jours d'incubation).

2.2.6/ Étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de souche n°18

Les résultats de l'étude de l'effet du pH, NaCl et température sur la croissance de la souche n°18 sont mentionnés dans le tableau n°11.

Concernant le pH, la croissance a été absente dans les pH acides (5 et 6). À pH 7, la croissance a été bonne. Aux pH alcalins (8, 9 et 10) la croissance a été lente mais bonne. Ce qui nous permet de classer la souche comme **neutrophile et alcaliphile**.

Concernant le NaCl, la souche ne s'est développée qu'aux concentrations de 0% (après 24h), 0,5% et 3% de NaCl (après 3 jours d'incubation). Ceci nous permet de classer la souche comme **halotolérante et légèrement halophile**.

Tableau 11 : Les résultats de l'étude de différents paramètres physico-chimiques sur la croissance de souche n° 18 après 10 jours d'incubation.

Souche n° 18										
pH	Temps d'incubation (jours)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
8	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++
9	-	-	+	+	+	+	+++	+++	+++	++++
10	-	-	-	-	-	-	+	+	++	+++
NaCl (%)										
0	+	+	+	+	+	+	++	+++	++++	++++
0,5	-	-	+	+	+	+	+	++	++	+++
3	-	-	+	+	+	+	+	+	++	+++
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Température (°C)										
4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
40	-	+	+	+	+	+	++	++	++	++
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Concernant la température, les colonies sont apparues aux températures 37°C (après 24h d'incubation) et 40°C (après 48h d'incubation). L'apparition de quelques colonies a été constatée aux températures 4°C (après 7 jours d'incubation), 10°C (après 6 jours d'incubation) et à 20°C (après 24h d'incubation). Ce qui nous permet de classer la souche comme **psychrotolérante et mésophile**.

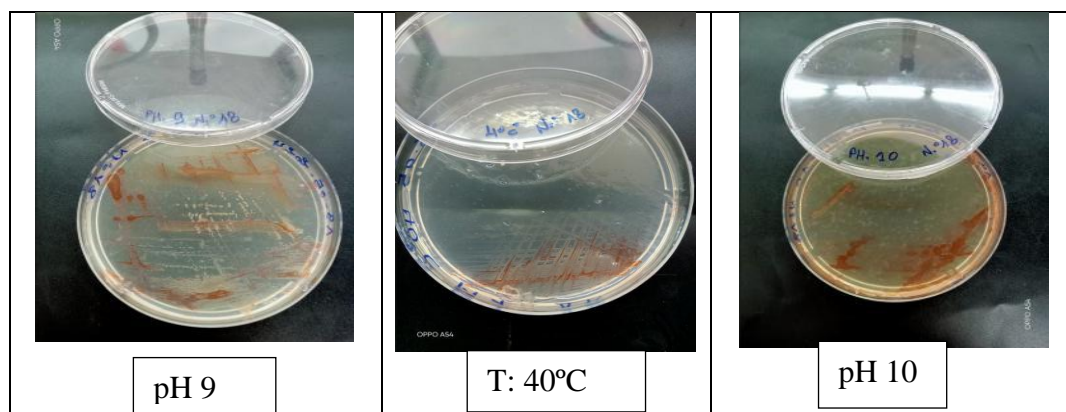


Figure 18 : Photographies de la croissance de la souche n°18 aux pH 9, pH 10, et à température 40°C après 10 jours d'incubation.

L'aptitude des bactéries halophiles à se développer dans des diverses conditions physico-chimiques constitue une étape clé dans leurs identification et classification (Jin et Kirk, 2018 ; Sánchez-clementé *et al.*, 2018 ; Hassabo *et al.*, 2022 ; Pérez-inocencio *et al.*, 2023 ; Bernardit *et al.*, 2024).

Pérez-inocencio *et al.*, 2023, ont testé l'aptitude de 20 bactéries isolées à partir d'une rhizosphère de la plante *Sesuvium verrucos* à se développer dans un intervalle de pH compris entre 5 et 11. Leurs résultats ont montré que la croissance de la majorité de ces bactéries halophiles a été optimale dans l'intervalle de 6 à 11, et ont été alors classées comme neutrophiles-alcaliphiles. 40% (8 souches) ont été classées comme des acidotolérantes vu qu'elles ont pu se développer à un pH de 5. Finalement, une seule souche a été exclusivement neutrophile puisqu'elle a développé à pH 7 uniquement.

Dans un cette même étude, ces bactéries halophiles ont été testées pour leur capacité à se développer dans des différentes concentrations de NaCl allant de 0% à 25%. Leurs résultats ont montré que la totalité (100%) des souches ont été légèrement à modérément halophiles (où 95% ont été halophiles légères et 65% ont été leurs majorités halophiles modérées), leur majorité (85%) ont été des halotolérantes puisque leur croissance a été observée en présence ou en absence de NaCl. Finalement, les halophiles extrêmes ont représenté une minorité (40%).

Dans une autre étude réalisée par Parashad *et al.*, 2020, l'aptitude de 4 souches bactériennes halophiles isolées à partir des sols de plages in Guyana à croître à des températures de 10C°, 37C° et 45C° a été testée. La totalité des souches (100%) ont

présenté une croissance optimale à 37C° (mésophiles), 50% à des températures supérieures à 45C°(thermophiles). Finalement, aucune souche n'a été classée comme psychrophile.

3/ Recherche de la production de la L - arginase et la L –methioninase

Les résultats de la production des enzymes recherchée par des bactéries halophiles sont mentionnées dans le tableau n° 12 et le figure n° 19.

Tableau 12 : Les résultats de la production des enzymes L-arginase et L-méthioninase par les bactéries halophiles après 10 jours d'incubation.

L'enzyme recherchée	Souches						Pourcentage de la production enzymatique (%)	
	1	2	5	10	13	18	Positive	Négative
L-arginase	+	+	+	+	-	-	67	33
L-méthioninase	+	+	-	+	-	-	50	50

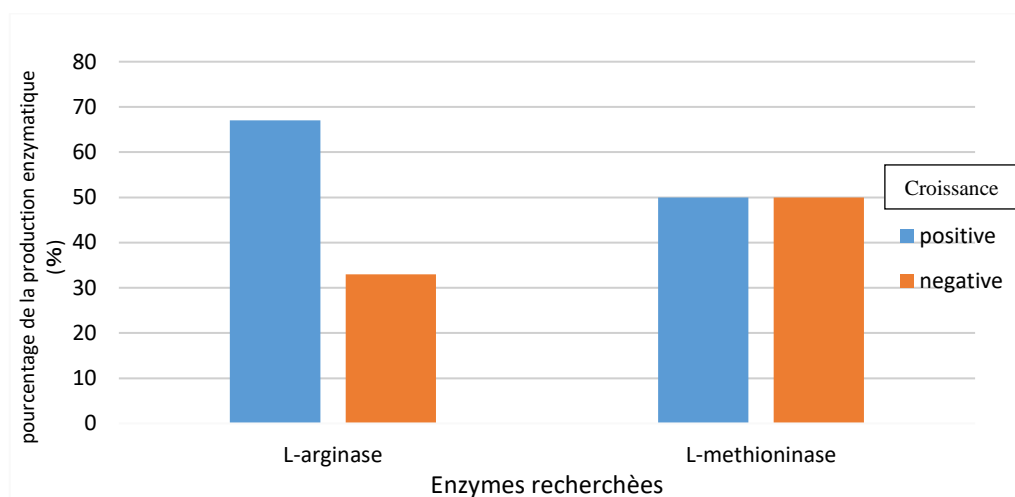


Figure 19 : Les résultats de la production des L-arginase et L-méthioninase par les souches halophiles après 10 jours d'incubation.

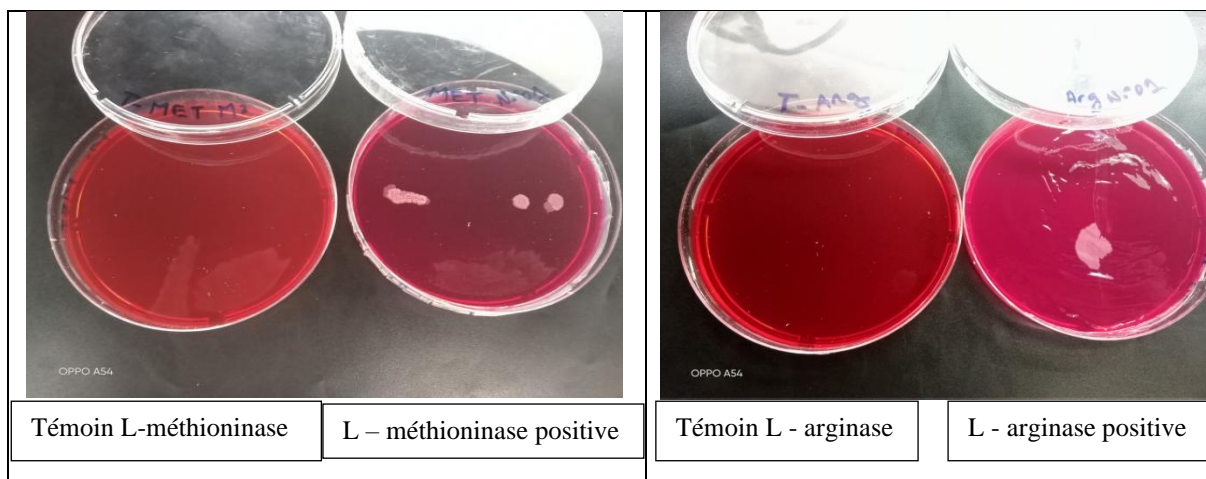


Figure 20 : Photographies démontrant la production de la L - méthioninase et la L - arginase par la souche n°1.

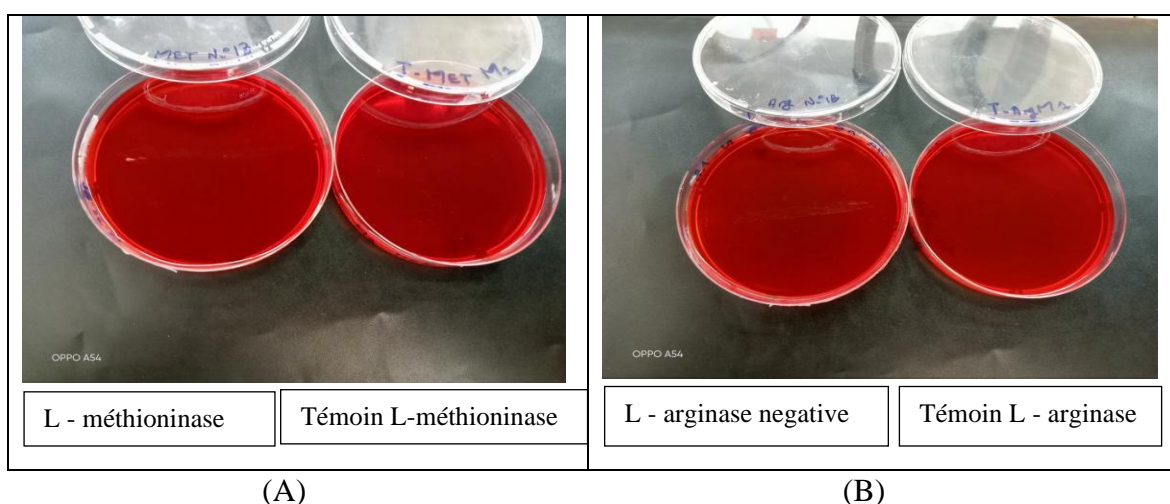


Figure 21 : Photographies démontrant l'absence de la production de la L - méthioninase et la L - arginase par la souche n°13 (A) et la souche n°18 (B)

La L- arginase et la L-méthioninase sont deux enzymes importantes en industrie alimentaire où elles sont utilisées dans la production d'arômes, plus particulièrement dans l'industrie laitière : fabrication des fromages tels que le limberge, le camembert, le fromage bleu, le cheddar, le livarot et le munster. Le méthanthiol, l'un des produits de la dégradation de la L-méthionine par l'action de la L-méthioninase peut réagir avec l'acyl-coenzyme A (acylCoA) et former plusieurs métabolites sulfureux comme la dimethylsulfide (DMDS), dimethyltrisulfide (DMTS) et les S-methylthioesters utilisés comme agents aromatiques (**Hassan Mohamed *et al.*, 2022**).

De rares travaux ont été menés sur les deux enzymes : la L-arginase et la L-méthioninase à partir des bactéries halophiles et même leur production a été faible comparée à d'autres enzymes produites, c'est l'exemple de l'étude réalisée par **Zolfaghar *et al.*, 2019**, qui ont isolé 110 souches bactériennes halophiles à partir de différents environnements salins en Iran, parmi lesquelles une seule souche a pu produire la L-arginase, et a été identifiée comme *Planococcus* sp.

Conclusion et perspectives

Les bactéries halophiles sont des bactéries extrêmophiles, ayant des caractéristiques singulières qui ont suscités l'attention des scientifiques pour connaître et comprendre leur comportement dans leurs environnements naturels. La maîtrise et la compréhension de leurs mécanismes physiologiques et métaboliques permet des applications biotechnologiques à des fins multiples et variées.

L'objectif de notre travail a été d'étudier l'effet de trois paramètres physico-chimiques (température, pH, et NaCl) sur la croissance de quelques bactéries halophiles, ainsi que tester leur aptitude à synthétiser deux enzymes : la L-arginase et la L-méthioninase.

Les résultats rapportés dans la présente étude, ont montré que :

- La majorité des bactéries halophiles étudiées (83%) ont tendance à être des neutrophiles-alcaliphiles, tandis que les acidotolérantes sont minoritairement présentes.
- La réponse des bactéries halophiles aux différentes concentrations de NaCl, nous a aidé à déduire que les bactéries halotolérantes et légèrement à modérément halophiles sont les dominantes.
- Leur majorité a pu croître à une température de 37C°, ce qui nous permet de les classer comme mésophiles.
- L'étude de l'aptitude à produire la L-arginase et la L-méthioninase montre que la moitié (50%) des souches bactériennes halophiles testées avait la capacité de produire ces deux enzymes.

En perspective pour ce travail, il est recommandé :

- De procéder à la production et l'extraction des enzymes L-arginase et L-méthioninase, car leurs utilisation ouvert la voie vers une biotechnologie future : médicale, alimentaire, industrielle....
- D'étudier l'aptitude des bactéries halophiles à tolérer d'autres paramètres physico-chimiques.

Références bibliographiques

A

- **Al-Rubaye, M., El-Musawi, M., Fakhari, J., Hosseini, M. (2017).** Screening and characterization of halophilic bacteria with industrial enzymes from salt lake Razazah, Karbala, Iraq. *PlumX article matrix*, 14(2). <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2476>

B

- **Bernardita, v., Solís-Cornejo, F., Araya, R., Zamorano, P. (2024).** Isolation of thermophilic Bacteria from extreme environments in Northern Chile. *Microorganisms* ,12(3), pp :473. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030473>
- **Besse, A. (2016).** Interactions microbiennes et adaptations en milieu extrême : peptides antimicrobiens d'archées halophiles. Thèse : Microbiologie et parasitologie. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS. Français. <https://theses.hal.science/tel-01592394>
- **Biswas, J., Paul, A. (2017).** Diversity and production of extracellular polysaccharide by halophilic microorganisms. *Biodiversity international journal*,1(2), pp. 1-9. [10.15406/bij.2017.01.00006](http://dx.doi.org/10.15406/bij.2017.01.00006)
- **Brennan, C., Garrett, W. (2019).** *Fusobacterium nucleatum* - symbiote, opportuniste and oncobactérie. *Nat rev microbio*, 17(3), pp: 156-166. [10.1038/s41579-018-0129-6](https://doi.org/10.1038/s41579-018-0129-6)

C

- **Cui, H., Dyll-Smith, M. (2021).** Cultivation of halophilic archaea (class *Halobacteria*) from thalassohaline and athalassohaline environments. *Marine life science & technology*, 3, pp: 243-251. <https://link.springer.com/article/10.1007/s42995-020-00087-3>

D

- **Daoud, L., Ben Ali, M. (2020).** Halophilic microorganisms: interesting group of extremophiles with important applications in biotechnology and environment. *Physiological and biotechnological aspects of extremophiles*, pp: 51-52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00005-8>
- **Delgado-García, M., Contreras-Ramos, S., Rodríguez, J., Mateos-Díaz, C., Aguilar, C., Camacho-Ruíz, R. (2018).** Isolation of halophilic bacteria associated with saline and alkaline-sodic soils by culture dependent approach. *Heliyon*, 4(11). [doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00954](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00954)
- **Detay, M., Thomas, P. (2018).** Les extrémophiles dans leurs environnements géologiques : un nouveau regard sur la biodiversité et sur la vie terrestre et extraterrestre. *Ressources scientifiques pour l'enseignement des sciences de la terre et de l'univers*, pp :28. <https://planet-terre.ens-lyon.fr/ressource/extremophiles.xml>
- **Diane Cacciarella.2021** [en ligne](page consultée le 14.03.2021). <https://www.frequencemedicale.com/medecine-generale/auteurs/2232-cacciarelladiane/p-22>
- **Drissi, LB., Anissi, J., Sendide, KH., El Hassoun, M.(2020).** Diversity of hydrolase-producing halophilic bacteria and evaluation of their enzymatic activities in submerged cultures. *Annals of Microbiology*, 70(33). <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01570-z>
- **Dubinina, G., Grabovitch, M., Leshcheva, N., Gronow, S., Gavrish, E., Akimov, v.(2015).** Spirochaetasinacasp. nov, un spirochète halophile isolé d'un tapis cyanobactérien. *Int j systemolmicrobiol*, 65(11), pp:3872-3877. [10.1099/ijsem.0.000506](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000506).
- **Dutta, B., Bandopadhyay, R.(2022).** Biotechnological potentials of halophilic microorganisms and their impact on mankind. *Beni-suef univ j basic appl sci*, 11(1). <https://bjbas.springeropen.com/articles/10.1186/s43088-022-00252-w>

G

- **Galisteo, C., R. de la Haba, R., Sánchez-Porro, C., Ventosa, A. (2023).** Un pas dans la biosphère rare : caractéristiques génomiques du nouveau genre *Terrihalobacillus* et de la nouvelle espèce *Aquibacillusalsiterrae* provenant de sols hypersalins. *Devant. Microbiol*, 2. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2023.1192059/full>
- **Gupta, S., Sharma, P., Dev, K., Sourirajan, A. (2020).** Isolation of gene conferring salt tolerance from halophilic bacteria of Lunsu, Himachal Pradesh, India. *J Genet Eng Biotechnol*, pp:18-57. [doi: 10.1186/s43141-020-00070-6](https://doi.org/10.1186/s43141-020-00070-6)

H

- **Hamad, I., Cardilli, A., Côte-Real, B., Dyczko, A., Vangronsveld, L., Kleinewietfeld, M. (2021).** High-Salt diet induces depletion of lactic acid-producing Bacteria in Murine Gut. *Nutrients*, 14(6).[doi: 10.3390/nu14061171](https://doi.org/10.3390/nu14061171)
- **Hassabo, A., Selim, M., Saad, M., Abdelraof, M. (2022).** Optimization of L-methioninase and L-arginase production by newly isolated marine yeast using response surface methodology. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 42. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102383>
- **Hernandez-Maldonado, J., Stoneburner, B., Boren, A., Miller, L., Rosen, M., Oremland, R., Saltikov, C. (2016).** Séquence génomique de la bactérie photoarsénotrophe *Ectothiorhodospira* sp. Souche BSL-9, isolée d'un environnement extrême hypersalin alcalin riche en arsenic. *Journaux ASM*, 4(5).<https://doi.org/10.1128/genomea.01139-16>

J

- **Jadhav, K., Kushwah, B., Jadhav, I. (2018).** Insight into compatible solutes from halophiles: Exploring significant applications in biotechnology, in *Springer eBooks*, pp: 291–307. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053-0_16
- **Jin, Q., F. Kirk, M. (2018).** pH as a primary control in environmental microbiology: 1. thermodynamic perspective. *Front. environ. sci*, 6. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00021>

K

- **Khairil Anwar, N.A.K., Idris, A., Hassan, N. (2020).** Isolation and identification of halophilic microorganisms in soy sauce. *Food research*, 4 (2), pp:84 – 87. https://www.myfoodresearch.com/uploads/8/4/8/5/84855864/_12_fripsbs04_khairil_anwar.pdf

- **Kothe, C. (2021).** Diversité des bactéries halophiles dans l'écosystème fromager et étude de leurs impacts fonctionnels. *Hal open science*. Biochimie, Biologie moléculaire, université Paris-Saclay. https://pastel.hal.science/tel-03223093/file/94434_KOTHE_2021_archivage.pdf
- **Kumar, V., Tiwari, S. (2019).** Halocin diversity among halophilic archaea and their applications, in Springer eBooks, pp: 497–532. https://doi.org/10.1007/978-981-13-%208315-1_16
- **Kumar, V., Tiwari, S. (2019).** Halocin diversity among halophilic archaea and their applications, in Springer eBooks, pp: 497–532. https://doi.org/10.1007/978-981-13-%208315-1_16

L

- **Lach, J., Jecz, P., Strapagiel, D., Matera-Witkiewicz, A., Staczek, P. (2021).** The Methods of digging for “Gold” within the salt: characterization of halophilic prokaryotes and identification of their valuable biological products using sequencing and genome mining tools. *Genes* 2021, 12(11), pp:1756. <https://www.mdpi.com/2073-4425/12/11/1756>
- **Leão, I., Carvalho, T., Henriques, V., Ferreira, V., Sampaio-Maia, B., Manaia, c.(2023).** Pseudomonadota in the oral cavity: a glimpse into the environment-human nexus. *Applied microbiology and biotechnology*, 107, pp:517–534. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-022-12333-y>
- **Lefebvre, O (2020).** Application des micro-organismes halophiles au traitement des effluents industriels hypersalins. Thèse : Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole nationale supérieure agronomique de montpellier, France. <https://hal.inrae.fr/tel-02833422/document>

M

- **Mahdis Zolfaghar, M., Ali Amoozegar, M., Khajeh, K., Babavalian, H., Tebyanian, H.(2019).** Isolation and screening of extracellular anticancer enzymes from halophilic and halotolerant bacteria from different saline environments in Iran. *Molecular biology Reports*, 46, pp: 3275-3286. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-019-04787-7>
- **Menasria, T. (2020).** Biodiversité microbienne dans les milieux extrêmes salés du nord-est Algérien. Thèse de doctorat. Université de Batna 2. <http://eprints.univ-batna2.dz/1856/>

- **Mohamed, H., Abou Zeid, A., El-Sayed, A., EL Shawadfy, A. (2022).** Short review on microbial L- methioninase and its applications. *Bulletin of faculty of science, Zagazig university (BFSZU)*, 2022(4), pp:107-133 [10.21608/bfszu.2022.148461.1155](https://doi.org/10.21608/bfszu.2022.148461.1155)
- **Monzón, G., Nisenbaum, M., Seitz, K., Murialdo, S.(2018).** New findings on aromatic compounds degradation and their metabolic pathways, the biosurfactant production and motility of the halophilic bacterium *Halomonas* sp. KHS3. *Currmicrobiol*, 75(8), pp:1108-1118.[.doi: 10.1007/s00284-018-1497-x.](https://doi.org/10.1007/s00284-018-1497-x)

P

- **Pagels, F., A. Guedes, C. (2023).** β -Carotene from *Dunaliella*: production in food/feed, and recent advance. *ResearchGate*, pp:56. https://www.researchgate.net/publication/371860119_bCarotene_from_Dunaliella_Production_applications_in_foodfeed_and_recent_advances
- **Pérez-Inocencio, J., Iturriaga, G., Aguirre-Mancilla, C., Ramírez-Pimentel, J., Vásquez-Murrieta, S., Álvarez-Bernal, D. (2022).** Identification of halophilic and halotolerant Bacteria from the root soil of the halophyte *Sesuvium verrucosum* Raf. *Plants (Basel)*, 11(23). [10.3390/plants11233355](https://doi.org/10.3390/plants11233355)
- **Pimbert, A. (2016).** Processus de déclenchement de l'événement océanique anoxique 2 : étude géochimique de sédiments atlantiques. Thèse de doctorat : Sciences de la Terre. Université Grenoble Alpes, Français.
- **Plemenitaš, A. (2021).** Sensing and responding to hypersaline conditions and the HOG signal transduction pathway in fungi isolated from hypersaline environments: *Hortaea werneckii* and *Wallemia ichthyophaga*. Faculty of medicine, Institute of biochemistry and molecular biology, university of Ljubljana, **7(II)**, pp: 988. <https://doi.org/10.3390/jof7110988>

S

- **S- Buhungu, S., Montchowui, E., Barankanira, E., C. Sibomana, C., G. Ntakimazi, G., C.A. Bonou, C. (2018).** Caractérisation spatio-temporelle de la qualité de l'eau de la rivière Kinyankonge, affluent du Lac Tanganyika, Burundi. *Int. j. biol. Chem. sci*, 12(1), pp:576-595 <http://www.ifgdg.org>

- **Salma, M., Abdulla, M., Samina, M.(2020).** Osmoadaptation in halophilic bacteria and archaea. *Research journal of biotechnology*, 15. https://www.researchgate.net/publication/341881730_Osmoadaptation_in_halophilic_bacteria_and_archaea
- **Sánchez-Clemente, R., Igeño, M., Población,A., Guijo, M., Merchán, F., Blasco, R.(2018).**Study of pH changes in media during bacterial growth of several environmental strains. *Environment green technology, and engineering international conference*, 2(20), pp:1297. <https://doi.org/10.3390/proceedings2201297>
- **Sánchez-Porro, C. (2023).**Halophilicmicroorganisms. *Microorganisms*, 11(3), pp.690. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030690>
- **Sanogo, A. (2023).** Caractérisation des bactéries halophiles isolées depuis la Sebkha de Ain Yagout-Batna pour la fabrication d'une crème solaire à la base d'éctoine. Mémoire Master Recherche : Biologie moléculaire des microorganismes-Université des frères Mentouri Constantine 1., 24p.
- **Sricharoen, W., Chotechuang, N., Prakitchaiwattana, C. (2023).** Pigments from halophilic bacteria isolated from salty fermented foods, bioactivity and safety for further development as bio/natural-food additives. *Food agricultural science and technolog*, 1. <https://ph02.tci-thaijo.org/index.php/stej/article/view/246166>

T

- **Toffin, L. (2020).** Micro-organismes halophiles et applications biotechnologiques. *Applications biotechnologiques des halophiles*. [Techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/ressources-marines-et-biotechnologies-bleues-42834210/micro-organismes-halophiles-bio9045/applications-biotechnologiques-des-halophiles-bio9045niv10003.html](https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/ressources-marines-et-biotechnologies-bleues-42834210/micro-organismes-halophiles-bio9045/applications-biotechnologiques-des-halophiles-bio9045niv10003.html)
- **Trung, L. (2020).** Comment les plantes supportent-elles un régime salé ? [en ligne]. (page consultée le (17-09-2020)). <https://www.encyclopedie-environnement.org/vivant/comment-plantes-supportent-regime-sale/>
- **Tsagogiannis, E., Asimakoula, S., Drainas, A., Marinakos, O., Boti, V., Kosma, I., Koukkou, A. (2024).** Elucidation of 4-Hydroxybenzoic acid catabolic pathways

in *Pseudarthrobacterphenanthrenivorans* Sphe3.MDPI journal list, 25(2).
<https://www.mdpi.com/1422-0067/25/2/843>

V

- Venil, C., Malathi, M., Ponnuswamy Renuka Devi, P. (2021). Characterization of *Dietziamaris* AURCCBT01 from oil-contaminated soil for biodegradation of crude oil. *Biotech*, 11(6), pp:291. [doi: 10.1007/s13205-021-02807-7](https://doi.org/10.1007/s13205-021-02807-7)
- Verma, A., Kumar, S., Mehta, P. (2020). Physiological and genomic perspective of halophiles among different salt concentrations. *Physiological and biotechnological aspects of extremophile*, 11, pp: 137-151. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00011-3>
- Vigneshwari, J., Arjunan, G., Manikandan, P., Senthilkumar P. K. (2023). Review on halophilic microbes and their applications. *ResearchGate*, 10(10), pp: 23-36. https://www.researchgate.net/publication/358573389_Review_on_halophilic_microbes_and_their_applications

W

- Wang, P., Jia, s., Liu, G., Chi, Z., Chi, Z. (2022). *Aureobasidium* spp. And their applications in biotechnology. *Process Biochemistry*, 116, pp: 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.03.006>
- Wu, J., McGenity, J., Rettberg, P., Simões, M., Li, W., Antunes, A. (2022). The archaeal class *Halobacteria* and astrobiology: knowledge gaps and research opportunities. *Sec. extrememicrobiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1023625>

X

- Xie, F., Pathom-aree, W. (2021). Actinobactéries du désert : diversité et applications biotechnologiques. *Microbiol avant*, 12. [10.3389/fmicb.2021.765531](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.765531)

Annexes

Milieux de culture des bactéries halophiles

Milieu M1

NaCl	175g
CaCl₂-2H₂O	0.1g
MgCl₂-6H₂O	20g
Extrait de levure	5g
K₂SO₄	5g
Agar	20g
Eau distillée	1000 ml
pH	7

Milieu M3

NaCl	100g
Glucose	4g
MgSO₄	0.12g
FeSO₄	0.0006g
(NH₄)² SO₄	1.98g
KH₂PO₄	13.61g
Agar	20g
Eau distillé	1000 ml
pH	7

Milieu de base utilisé pour les testes enzymatiques

M1 (L-argininase)

NaCl	175g
Peptone	5g
Extrait de levure	3g
L-arginine	10g
Rouge de phénol	0.012g
Eau distillée	1000ml
Agar	30g
pH	7

M1 (L-méthioninase)

NaCl	175g
Peptone	5g
Extrait de levure	3g
L-méthionine	10g
Rouge de phénol	0.012g
Eau distillée	1000mL
Agar	30g
pH	7

M3 (L-argininase)

NaCl	100g
Peptone	5g
Extrait de levure	3g
L-arginine	10g
Rouge de phénol	0.012g
Eau distillée	1000ml
Agar	30g
pH	7,2

M3 (L-méthioninase)

NaCl	100g
Peptone	5g
Extrait de levure	3g
L-méthionine	10g
Rouge de phénol	0.012g
Eau distillée	1000ml
Agar	30g
pH	7,2

Solutions pour ajustement de pH

1M NaOH : 10g de pastilles de NaOH dans 250 ml d'eau distillée.

1M HCL : 183.6 ml d'HCL et 16.4 ml d'eau distillée pour obtenir 200mL.

Résumés

Résumé

La présente étude a été menée pour déterminer la capacité de six souches de bactéries halophiles à se développer dans certaines conditions physiologiques et à produire certaines enzymes.

Ces souches ont été inoculées sur milieux M1 et M3 :

- Incubée à 4C°, 10C°, 20C°, 37C°, 40C°, 50C° et 60C° pour étudier leur tolérance à la température.
- Préparés et ajustés à plusieurs pH : 5, 6, 7, 8, 9 et 10 pour étudier leur tolérance au pH.
- Préparés avec 0%, 0,5%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20% et 25% de NaCl pour étudier leur aptitude à croître dans des conditions salines.

Elles ont été également inoculées sur deux milieux contenant de la L-arginine et de la L-méthionine comme substrats pour détecter leur capacité à produire les enzymes L-arginase et L-méthioninase consécutivement.

Les résultats de notre étude ont révélé que :

Toutes les souches ont pu se développer à pH 7 et pH 8 (100%). Leur majorité a pu croître à pH 9 et 10 (83%). Aux pH acides, la croissance a remarquablement diminué pour atteindre 50% à pH 6 et 33% à pH 5.

La majorité des souches bactérienne (83%) ont pu croître à une concentration de NaCl de 3%. 67% des souches ont montré une croissance à des concentrations de 0.5%, 5%, 10% et 15% de NaCl. La moitié des souches ont pu se développer dans le milieu préparé sans NaCl et le milieu préparé avec une concentration de NaCl de 20%. Finalement, aucune souche n'a pu se développer à une concentration de 25% de NaCl.

Toutes les souches ont pu développer à une température de 40°C (100%). 33% ont pu croître aux températures de 10°C et de 20°C. Aux températures extrêmes, la croissance a remarquablement diminué : 17% ont pu développer à température de 4°C et 50°C et aucune croissance n'a été observée à la température de 60°C.

La majorité des souches ont pu produire la L-arginase (67%) et leur moitié ont pu produire la L-méthioninase (50%).

Mots clés : bactéries halophiles, température, pH, NaCl, L-arginase, L-méthioninase, paramètres physico-chimiques.

Abstract

The present study was conducted to determine the ability of six halophilic bacteria strains to grow under some physiological conditions and to produce some enzymes.

These strains were inoculated onto M1 and M3 media:

- Incubated at 4°C, 10°C, 20°C, 37°C, 40°C, 50°C and 60°C to study their temperature tolerance.
- Prepared and adjusted to several pH: 5, 6, 7, 8, 9 and 10 to study their pH tolerance.
- Prepared with 0%, 0.5%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20% and 25% of NaCl to study their saline aptitude.

They were also inoculated onto two media containing L-arginine and L-methionine as substrates to detect their ability to produce L-arginase and L-methioninase enzymes consecutively.

The results revealed that:

All strains were able to grow at pH 7 and pH 8 (100%). The majority were able to grow at pH 9 and 10 (83%). At acidic pH levels, growth significantly decreased, reaching 50% at pH 6 and 33% at pH 5.

Most bacterial strains (83%) were able to grow at a NaCl concentration of 3%. 67% of the strains showed growth at NaCl concentrations of 0.5%, 5%, 10%, and 15%. Half of the strains were able to grow in the medium prepared without NaCl and the medium prepared with a NaCl concentration of 20%. Finally, no strain was able to grow at a NaCl concentration of 25%.

All strains were able to grow at a temperature of 40°C (100%). 33% were able to grow at temperatures of 10°C and 20°C. At extreme temperatures, growth significantly decreased: 17% were able to grow at temperatures of 4°C and 50°C, and no growth was observed at 60°C.

Most of the strains were able to produce L-arginase (67%) and half of them were able to produce L-methioninase (50%).

Keywords: halophilic bacteria, temperature, pH, NaCl, L-arginase, L-methioninase, physico-chemical parameters.

المخلص

لقد تمت دراستنا على ست بكتيريا محبة للملوحة و هدفت إلى تحديد قدرتها على النمو تحت شروط فيزيولوجية معينة من درجة حرارة، درجة حموضة و تراكيز ملح (كلوريد الصوديوم) و كذلك تحديد قدرتها على إنتاج بعض الإنزيمات.

إعتمدت التقنيات على زرع البكتيريا في وسطين M1 و M3.

- وضعت تحت حضن في درجات الحرارة من 4 إلى 60 درجة مئوية.

- معدلين في درجة حموضة (pH) مختلفة من 5 إلى 10.

- وضعت تحت الحضن في درجة حرارة 37 درجة مئوية.

كما زرعت العينات على أوساط مغذية خاصة تحتوي على الارجنين و الميثيونين لتحديد قدرتها على إنتاج الإنزيمين : الأرجيناز و الميثيونيناز.

بينت النتائج المحصل عليها ما يلي:

جميع السلالات كانت قادرة على النمو عند درجة حموضة 7 ودرجة حموضة 8 (100%). وكان معظمها قادراً على النمو عند درجة حموضة 9 و 10 (83%). عند درجة الحموضة العالية، انخفض النمو بشكل ملحوظ، حيث وصل إلى 5% عند درجة الحموضة 6 و 33% عند درجة الحموضة 5.

غالبية السلالات البكتيرية (83%) تمكنت من النمو عند تركيز كلوريد الصوديوم 3%. أظهرت 67% من السلالات نمواً عند تراكيز كلوريد الصوديوم 0.5%، 5%، 10%، و 15%. نصف السلالات كانت قادرة على النمو في الوسط المحضر بدون كلوريد الصوديوم والوسط المحضر بتركيز كلوريد الصوديوم 20%. وأخيراً، لم تتمكن أي سلالة من التطور بتركيز 25%.

جميع السلالات كانت قادرة على النمو عند درجة حرارة 40 درجة مئوية (100%). 33% كانت قادرة على النمو عند درجات حرارة 10 درجة مئوية و 20 درجة مئوية. في درجات الحرارة القصوى، انخفض النمو بشكل ملحوظ: 17% كانت قادرة على النمو عند درجة حرارة 4 درجات مئوية و 50 درجة مئوية ولم يلاحظ أي نمو عند درجة حرارة 60 درجة مئوية.

غالبية السلالات كانت قادرة على إنتاج إنزيم الأرجيناز (67%) و نصفها قادراً على إنتاج إنزيم الميثيونيناز (50%).

تكم أهمية إنزيم الأرجيناز و الميثيونيناز في إمكانية استعمالها في الصناعة الغذائية لأن المنتجات الناجمة عن تحليل الميثيونين مثلاً، تصنف كموايد منكهة في ميدان الصناعة الغذائية.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا المحبة للملوحة، درجة الحرارة، درجة الحموضة، درجة الملوحة، الأرجيناز، الميثيونيناز، الشروط الفيزيولوجية.

Année universitaire: 2023-2024

Présenté par :

ZITOUNI Amel

GOMBA Oscar Ramos

Étude des caractéristiques physico-chimiques et enzymatiques de quelques bactéries halophiles.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie appliquée.

La présente étude a été menée pour déterminer la capacité de six souches de bactéries halophiles à se développer dans certaines conditions physiologiques et à produire certaines enzymes. Ces souches ont été étudiées pour leur tolérance à différentes températures (4C°, 10C°, 20C°, 37C°, 40C°, 50C°, 60C°), pH (5, 6, 7, 8, 9, 10) et concentrations de NaCl (0%, 0,5%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%). Elles ont aussi été testées pour leur capacité à produire les enzymes L-arginase et L-méthioninase en utilisant la L-arginine et la L-méthionine comme substrats.

Les résultats de notre étude ont révélé que toutes les souches ont pu se développer à pH 7 et pH 8 (100%). Leur majorité a pu croître à pH 9 et 10 (83%). Aux pH acides, la croissance a remarquablement diminué pour atteindre 50% à pH 6 et 33% à pH 5. La majorité des souches bactérienne (83%) ont pu croître à une concentration de NaCl de 3%. 67% des souches ont montré une croissance à des concentrations de 0.5%, 5%, 10% et 15% de NaCl. La moitié des souches ont pu se développer dans le milieu préparé sans NaCl et le milieu préparé avec une concentration de NaCl de 20%. Finalement, aucune souche n'a pu se développer à une concentration de 25% de NaCl. Toutes les souches ont pu développer à une température de 40°C (100%). 33% ont pu croître aux températures de 10°C et de 20°C. Aux températures extrêmes, la croissance a remarquablement diminué : 17% ont pu développer à température de 4°C et 50°C et aucune croissance n'a été observée à la température de 60°C. La majorité des souches ont pu produire la L-arginase (67%) et leur moitié ont pu produire la L-méthioninase (50%).

Mots-clés : bactéries halophiles, température, pH, NaCl, L-arginase, L-méthioninase.

Laboratoire : de pédagogie n°14 (U.Constantine 1, les Frères Mentouri).

Jury d'évaluation :

Présidente : DERABLI Bisma (MAB - U Constantine 1, Frères Mentouri).

Encadrante : MERIANE Ilhem (MAA- U Constantine 1, Frères Mentouri).

Examinatrice : Almi Hiba (MCB - U Constantine 1, Frères Mentouri).