

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de RELIZANE
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département des Sciences Biologiques



MEMOIRE
En vue de l'obtention du diplôme de MASTER en :
Microbiologie & contrôle de qualité
Intitulé

Isolement et caractérisation phénotypique des souches
bactériennes à partir de La saline d'Oued djemâa-Relizane

Présenté par :

Mme : SOUAFI Fatima Zohra
Mlle : BENDELLA Ikhlas
Mlle : BENBEKHTI Radia Amel

Devant les membres de jury :

Président : Mr BENAÏSSA Miloud	Maître de conférence (A)	(U. Relizane)
Encadreur : Mme MELIANI Meriem Fethia	Maître assistant (B)	(U. Relizane)
Examineur : Mme OUCIF Hanene	Maître de conférence (A)	(U. Relizane)

Année universitaire : 2024/2025

Remerciement

Tout d'abord, nous tenons à remercier "Allah"

le tout puissant et

*Miséricordieux, de nous avoir donné la santé, la force,
la volonté et la patience d'accomplir toutes nos études.*

Nous exprimons d'abord nos profonds

remerciements à notre

*Encadrant **Mme MELIANI MERIEM**, pour*

nous avoir encadré et dirigé ce travail

Ainsi que pour sa disponibilité, ses conseils et

pour son soutien et sa patience.

Nous tenons à gratifier aussi les membres de

Jury :

Dr Benaïssa M. et Dr Oucif H. de l'honneur qu'ils

nous font en acceptant d'évaluer ce travail et de

l'enrichir par leurs propositions et leurs conseils.

Nos remerciements s'adressent

également aux : Enseignants du département

SNV de l'université de Relizane pour leurs

qualités scientifiques et pédagogiques.

A toutes les personnes qui ont participé de près

ou de loin à la réalisation

Dédicace

Je remercie tout d'abord Dieu, pour m'avoir guidé, éclairé et soutenu dans la réalisation de ce travail.

Je dédie ce travail :

*À ma merveilleuse mère **LEILA**,
qui a toujours cru en moi et m'a encouragée à poursuivre mes rêves.*

Sans toi, je n'aurais jamais acquis la force et la résilience nécessaires pour atteindre ce stade.

Je t'aime maman, et j'implore le Tout-Puissant de t'accorder une bonne santé, une longue vie et un bonheur éternel.

*À mon cher **Papa**,
ma force, la prunelle de mes yeux, celui qui a rêvé de ce jour à mes côtés.*

Que Dieu te garde dans Son vaste paradis.

*A mes chers **oncles KADI et AHMED**, merci pour votre amour, votre soutien et votre présence rassurante*

*À mon frère **FAROUK**, pour l'amour sincère qu'il me témoigne.*

*À ma belle-sœur **SAMIHA**, pour sa douceur et sa présence.*

*À ma petite sœur adorée **DOUAA**, qui sait toujours comment semer la joie et le bonheur au sein de notre famille.*

*À toutes mes amies proches : **CHAFIKA, AYA, NIHAD** et **IMANE**.*

*À mes binômes **FATIMA** et **IKHLAS**, pour leur soutien précieux tout au long de ce parcours.*

Radia Amel

*Tout d'abord, je tiens à remercier **DIEU** De m'avoir
donné la force et le courage de mener
À bien ce modeste travail
Je dédie ce travail à moi-même
Fruit de plusieurs années d'efforts de sacrifices et
persévérance*

A mes parents :

*Mon très chers père **DJILLALI***

*Ma tendre mère **FATIMA***

*Qui ont été pour moi une lumière dans l'obscurité, un
refuge dans les épreuves, et une source inépuisable de
tendresse, de patience et de prières. Leur amour, leur
soutien moral et leurs sacrifices silencieux ont été la clé
de mon succès.*

*À mon frère **ABDELLAH** et mes sœurs **HABIBA** ;
AMINA ; **ZINEB** ; **MERIEM** ; **WASSILA**, pour leur
encouragement constant, leur compréhension et leur
fierté, qui m'ont porté et motivé à aller de l'avant.
À toute personne chère à mon cœur, qui ma soutenue,
fait confiance et s'est réjouie avec moi.*

*À mon binôme : **Radia** et **Fatima**.*

*À vous tous, je dédie humblement ce mémoire, en
témoignage de mon infinie reconnaissance et de mon
profond respect.*

Ikhlas

*Que ce travail témoigne de mes respects :
A mon soutien moral et source de joie et de
bonheur, celui qui s'est toujours avec moi pour
me voir réussir, que Dieu te protège, à toi mon
mari **MOHAMED**.*

*A la lumière de mes jours, la source de mes
efforts, la flamme de mon Cœur, ma vie et mon
bonheur, **mes parent** que j'adore.*

*A mes fleurs ; mes enfants : **ALAE ; ROEYA** et
ABED RAHMAN*

*A mes frères : **AMEUR** et **AMINE***

*A mes sœurs **SARAH** et **IMEN***

*A toute ma famille **SOUAFI** et a toute ma belle-
famille **BEN ELHADJ DJELLOUL***

Fatima Zohra

Résumé

Dans le cadre de l'étude de la diversité bactérienne dans des environnements aux caractéristiques inhabituelles, une étude microbiologique a été menée sur la sebkha d'Oued El Djemâa, située dans la wilaya de Relizane, afin d'identifier les différentes espèces bactériennes présentes et de caractériser leurs propriétés. Des échantillons de sol et d'eau ont été prélevés à partir du site, suivis de l'isolement des souches bactériennes. Les souches isolées ont ensuite été soumises à une série d'analyses physico-chimiques et de tests enzymatiques. Les résultats ont permis l'isolement de 21 souches bactériennes présentant des caractéristiques physico-chimiques variées. Certaines d'entre elles ont montré une capacité à produire des enzymes d'intérêt biotechnologique, ce qui met en valeur leur potentiel dans divers domaines d'application.

Mots-clés : Sebkhâ d'Oued El Djemâa, bactéries, isolement, analyses physico-chimiques, enzymes, biotechnologie

Abstract

As part of the study of bacterial diversity in environments with unusual characteristics, a microbiological investigation was conducted on the sebkha of Oued El Djemâa, located in the Relizane province, to identify the bacterial species present and to characterize their properties. Soil and water samples were collected from the site, followed by the isolation of bacterial strains. The isolated strains were then subjected to a series of physicochemical and enzymatic analyses. The results led to the isolation of 21 bacterial strains with diverse physicochemical properties. Some of these strains demonstrated the ability to produce enzymes of biotechnological interest, highlighting their potential for various applications.

Keywords: Sebkhha of Oued El Djemâa, bacteria, isolation, physicochemical analyses, enzymes, biotechnology

المخلص

في إطار دراسة التنوع البكتيري في البيئات ذات الخصائص غير الاعتيادية، تم إجراء دراسة ميكروبيولوجية على سبخة وادي الجمعة الواقعة بولاية غليزان، بهدف التعرف على الأنواع البكتيرية المتواجدة بها وتحديد خصائصها. شملت الدراسة جمع عينات من التربة والماء من موقع السبخة، تلاها عزل السلالات. بعد عملية العزل، خضعت السلالات لمجموعة من التحاليل الفيزيائية-الكيميائية والاختبارات الإنزيمية لتحديد خصائصها ووظائفها الحيوية.

أسفرت النتائج عن عزل 21 سلالة بكتيرية ذات خصائص فيزيائية وكيميائية متنوعة، أظهرت بعضها قدرة على إنتاج إنزيمات ذات أهمية بيوتكنولوجية، مما يبرز الإمكانيات التطبيقية لهذه السلالات في مجالات متعددة.

الكلمات المفتاحية: سبخة وادي الجمعة، بكتيريا، التحاليل الفيزيائية الكيميائية، الأنزيمات، البيوتكنولوجيا

Liste des Figures

01	Habitats thalassohalins : Chott Melghir (a) Menasria (2020) , Lac de sammure au fond de la Méditerranée Est (b) lfermer in Khallef (2019)	06
02	Habitats athalassohalins : Lac rosé au Sénégal (a) , Lac Maghadi au Kenya (b) (in Khallef , 2019)	06
03	Site de saline Oued Djemaa-Relizane	23
04	Situation géographique de la saline d'Oued Djemaa	23
05	Procédé d'Extraction de la Chitine à partir de Carapaces de Crevette	30
06	Distribution des isolats selon le milieu de culture	32
07	Photographe de neuf souches extremotolérantes (1, 2, 5, 7, 11,12,714,17,18) isolées de la Sebkha	33
08	Aspect microscopique de différentes souches d'actinomycètes après coloration de Gram (Gx100)	37
09	Photographie de l'observation microscopique après coloration de Gram de quelques bactéries	38
10	Répartition des bactéries extremotolérantes selon le type de Gram	39
11	Répartition des bactéries extremotolérantes selon les différentes formes cellulaires	40
12	Résultats de la galerie Api20E de quelques souches	43
13	Résultats de mannitol mobilité de quelques souches	45
14	Résultats de pigment mélanoïde pour les souches A1	46
15	Résultats de test caséinase	53
16	Résultats de test gélatinase	54
17	Résultats de Tween 80	55
18	Résultats de test hydrolyse de l'amidon	56
19	Résultats de test uréase	58
20	Résultats de test pectinase	59
21	Résultats de test chitinase	60

Liste des tableaux

I	Principaux Sebkhass en Algérie (Sahil ; 2021)	08
II	Aspect macroscopique et caractères cultureux de quelques colonies isolées à partir des échantillons de la Sebkhha d'Oued Djemma	34
III	Description microscopique des 21 souches extremotolérantes isolées de la Sebkhha	36
IV	Résultats de la galerie Api20E des isolats provenant de la Sebkhha d'Oued Djemma	41
V	Mise en évidence de l'activité catalase chez les isolats bactériens	43
VI	Mise en évidence de l'activité oxydase chez les isolats bactériens	44
VII	Résultats de l'effet de la température sur la croissance des bactéries isolées à partir de la Sebkhha d'Oued Djemma	47
VIII	Effet de pH sur la croissance des isolats	49
IX	Effet de la salinité sur la croissance des isolats provenant de la Sebkhha d'Oued Djemma	51
X	Résultats des activités enzymatiques des 21 souches sélectionnées	57

Liste des abréviations :

pH	Potentiel d'hydrogène
%	Pourcent
°C	Degré Celsius
CaCO₃	Carbonate de calcium
HCl	Chlorure d'hydrogène
G	Gramme
J	Jour
µm	Micromètre
ISP	International streptomyces project
GLM	Glucose Extrait de levure Malt
GN	Gélose nutritive
BN	Bouillon nutritif
T	Température
NaCl	Chlorure de sodium
L	Litre
P/V	Poids par volume

Tables des matières

Résumé

Listes des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

	Titre	Page
	Introduction générale	1
	Etude bibliographique	
	Les Zones humides et les bactéries extrémo-tolérantes	4
	1. Les zones humides	4
	1.1. Définition des zones humides	4
	1.2. Généralité sur les environnements salins et hyper_salins	5
	1.3. Diversité des environnements salins	5
	1.3.1. Environnements thalossohalins	5
	1.3.2. Environnements atalassohalins	6
	1.4. Les zones humides salines	7
	1.4.1 Les lacs salés	7
	1.4.2. Sebkha	7
	2. La diversité bactérienne des environnements extrêmes	9
	2.1. Les bactéries extrémotolérantes	9
	2.1.1. Généralités	9
	2.1.2. Propriétés	9
	2.1.3. Classification des bactéries extrémotolérantes	10
	- Les Bactéries thermotolérantes	10
	- Les Bactéries psychrotolérantes	10
	- Les Bactéries halotolérantes	11
	- Bactéries acidotolérantes	12
	- Les Bactéries alcalotolérantes	12
	2.2. Application biotechnologique des bactéries extrémotolérantes	13
	Identification des bactéries extrémotolérantes	
	1. Critères morphologiques	16
	1.1. Observation macromorphologique	16
	1.2. Observation microscopique après coloration de gram	16
	2. Identification chimique	16
	2.1. La galerie Api 20	16
	2.2. La catalase	16
	2.3. L'oxydase	17
	2.4. Mannitol mobilité	17
	2.5. Pigment mélanoidé	17
	3. Identification physique	17
	3.1. La tolérance au pH	17

3.2. La tolérance a la tempéraure	17
3.3. La tolérance a la salinité	18
4. Identification enzymatiques des bactéries extrémotolérantes	18
4.1. Caséinase	18
4.2. Gélatinase	18
4.3. Tween 80 (Lipase / Estérase)	19
4.4. Hydrolyse de l'amidon	19
4.5. Uréase	19
4.6. Pectinase	20
4.7. Chitinase	20

ETUDE PRATIQUE

Matériels et méthodes

1. Site de prélèvement de l'échantillon	23
1.1. Méthode de prélèvement	24
2. Prétraitement des échantillons	24
2.1. Cas du sédiment	24
2.2. Cas de l'eau	24
3. Isolement et purification des souches	25
3.1. Technique d'isolement et conditions d'incubation	25
3.2. Purification des souches	25
4. Identification des souches	26
4.1. Etude des caractères morphologiques	26
4.1.1. Etude macromorphologique	26
4.1.2...Etude micromorphologique	26
État frais	26
Coloration de Gram	26
5. identification biochimiques	26
5.1. Identification par galerie Api 20	26
5.2. La recherche de catalase	27
5.3. La recherche de l'oxydase	27
5.4. Mannitol mobilité	27
5.5. Recherche de pigment melanoide	27
6. Identification physique	27
6.1. La tolérance a la température	27
6.2. La tolérance au pH	27
6.3. La salinité	27
7. Etude des caractères enzymatiques	27
7.1. Recherche des protéases	27
7.1.1. Mise en évidence de l'activité caséinolytique	27
7.1.2. Mise en évidence de l'activité gélatinolytique	28
7.2. Recherche des lipases	29
7.2.1. Mise en évidence de l'activité lipolytique (Tween 80)	29
7.3. Recherche des sucres	29

7. 3.1. Mise en évidence de l'activité amylolytiques	29
7.4. Mise en évidence de l'activité uréolytique	29
7.5. Mise en évidence de l'activité pectinolytique	29
7.6. Mise en évidence de l'activité chitinolytique	30

Résultats et discussions

1. Caractérisation phénotypique	32
1.1. Influence de milieu de culture sur la diversité des souches isolées à partir de la sebkha d'Oued Djemaa	32
1.2. Purification	32
1.3. Identification macromorphologique	34
1.4. Identification micromorphologique	36
1.5. Identification biochimique	41
1.5.1. Identification par galerie Api 20E	41
1.5.2. La recherche de la catalase	43
1.5.3. La recherche d'oxydase	44
1.5.4. Mannitol mobilité	45
1.5.5. Pigment mélanoïde	46
1.6. Identification physiologique	47
1.6.1. Effet de la température sur la croissance des isolats	48
1.6.2. Effet de pH	49
1.6.3. La salinité	51
1.7. La mise en évidence des activités enzymatiques	52
1.7.1. Recherche des protéines	53
1.7.1.1. Dégradation de la caséine	53
1.7.1.2. Dégradation de la gélatine	54
1.7.2. Recherche des lipides	55
1.7.2.1. Dégradation du tween 80	55
1.7.3. Recherche des sucres	56
1.7.3.1. Dégradation de l'amidon	56
1.7.4. Dégradation des autres substrats	58
1.7.4.1. Dégradation de l'urée	58
1.7.4.2. Dégradation de la pectine	59
1.7.4.3. Dégradation de la chitine	59

Conclusion et perspectives

Références bibliographique

Annexes

Introduction

Le sol est reconnu comme une niche écologique essentielle pour une diversité exceptionnelle de micro-organismes capables de produire des composés naturels bioactifs (*Zhou et al., 2023*).

Les environnements salins et hypersalins sont des écosystèmes extrêmes caractérisés par une faible diversité bactérienne. Ils se distinguent par l'absence de nombreuses formes de vie (ce sont des environnements peu favorables à la prolifération des formes communes) et par la présence de communautés microbiennes autochtones spécifiques, adaptées à ces conditions. L'intérêt pour les microbes vivant dans ces milieux est considérable en raison de leur capacité à produire divers composés naturels et de leurs stratégies d'adaptation à ces conditions extrêmes (*Menasria, 2020*).

Ces communautés microbiennes comprennent notamment les bactéries extrêmotolérantes. L'identification de ces communautés dans des milieux auparavant jugés stériles a démontré que les critères physico-chimiques favorisant l'émergence de la vie sont bien plus étendus qu'on ne l'imaginait. Les entités désignées sous l'appellation « extrêmophiles » ne se limitent pas à endurer des conditions extrêmes ; elles prospèrent même dans de telles circonstances (*Franzetti, 2019*).

Ces extrêmophiles se démarquent par leur précieux répertoire enzymatique. Ceci est dû en partie à la demande restreinte d'enzymes qui tolèrent le sel dans les méthodes de productions actuelles ou les processus associés (*Kour et al., 2019*).

Parmi ces bactéries extrêmotolérantes, on retrouve les actinomycètes qui sont des bactéries saprophytes qui s'établissent sur une vaste gamme de substrats terrestres et aquatiques, dans un milieu physique et chimique en perpétuel changement. Elles possèdent des aptitudes métaboliques uniques, mais ce qui est primordial, c'est qu'elles sont parmi les sources les plus productives de métabolites secondaires bioactifs (*Kurt Boké, 2017*).

L'objectif principal de notre travail est d'étudier la biodiversité métabolique des bactéries extrêmotolérantes, notamment les actinomycètes qui en font partie, provenant des écosystèmes extrêmes où les conditions physico-chimiques sont défavorables à la vie microbienne (sols arides, salinité extrême...).

❖ La première partie consiste en l'isolement des bactéries extrêmotolérantes et des actinomycètes provenant de nos deux échantillons (sédiment et eau) pour ceci, il était

primordial de sélectionner des milieux de cultures sélectifs pour l'isolement ces bactéries, ainsi que des techniques favorisant la croissance de ce groupe de bactéries par rapport à l'autre micro-organisme du sédiment qui ont des taux de croissancetrès élevés comparé avec celui des bactéries.

❖ La deuxième partie consiste à effectuer des tests enzymatiques en vue de mettre en évidence la biodiversité métabolique de nos isolats, pour cette partie le choix des milieux de culture est aussi très important pour la bonne réussite des différents tests.

**Les Zones humides
et les bactéries
extrémotolérantes**

1. LES ZONES HUMIDES

1.1. DEFINITION DES ZONES HUMIDES :

L'expression « zones humides », traduction générale du terme anglais « *wetlands* », désigne des espaces situés à l'interface entre les milieux terrestre et aquatique. D'un point de vue écologique, ces zones se caractérisent par la présence permanente ou temporaire d'eau, ainsi que par des sols hydromorphes (*Skinner et Zalewski 1995*).

Les zones humides constituent des écosystèmes singuliers, jouant un rôle d'interface tampon entre les milieux terrestres et aquatiques (*Fustec et Lefeuvre, 2000*). Elles sont largement reconnues pour leur richesse écologique, servant de réservoirs de biodiversité (*Molina, 2005*) et de lieux essentiels pour sa conservation (*Serrano et Serrano, 1996*).

Les zones humides représentent environ 40 % de la valeur globale des services écosystémiques à l'échelle mondiale (Gardner et Finlayson, 2018). En tant qu'écosystèmes hydrologiques majeurs, elles jouent un rôle clé dans le cycle de l'eau, agissant à la fois comme sources et réservoirs, tout en soutenant une biodiversité élevée grâce à la régulation des cycles biogéochimiques, en particulier ceux de l'azote, du carbone et du phosphore. Elles assurent également des fonctions écologiques essentielles, telles que l'atténuation des extrêmes hydrologiques (crues et sécheresses), la filtration des polluants, et la séquestration du carbone atmosphérique, contribuant ainsi à la régulation climatique globale.

Cependant, ces écosystèmes sont parmi les plus menacés à l'échelle planétaire. Les changements globaux — incluant le changement climatique, l'urbanisation, l'agriculture intensive et l'altération des régimes hydrologiques — sont responsables de la disparition d'environ 21 % des surfaces humides mondiales (*Fluet-Chouinard et al., 2023*).

Les zones humides d'Afrique du Nord, situées en écotone entre les zones méditerranéennes et les milieux désertiques arides, sont particulièrement vulnérables. Soumises à des conditions abiotiques extrêmes (stress hydrique prolongé, températures élevées, forte évapotranspiration), elles subissent une pression accrue due au réchauffement climatique. Ces contraintes altèrent non seulement la composition et la dynamique des communautés biologiques, mais compromettent également la résilience fonctionnelle des services écosystémiques qu'elles assurent.

1.2. GENERALITE SUR LES ENVIRONNEMENTS SALINS ET HYPER-SALINS

Les environnements salins et hyper-salins sont considérés comme étant des écosystèmes extrêmes pour un organisme ou essentiel pour la survie des autres organismes (*Madigan et Marrs, 1997*). Ce terme a été utilisé pour la première fois par MacElroy en 1974. Ces biotopes sont connus par leurs propriétés géochimiques, leurs populations microbiennes et leur attirance esthétique uniques (*Paul et Mormile, 2017*). Ce type d'environnement est très répandu sur notre planète y compris en Algérie (*Litchfield et Gillevet, 2002*).

Il existe principalement, deux types majeurs d'environnement hyper-salins représentés par le sol et l'eau. Les sols sont considérés comme salins lorsqu'elles contiennent une concentration en sels soluble supérieure à 0.2% (p/v) (*Kaurichev et al., 1980*). Pour les eaux, elles sont considérées comme salins lorsque la salinité dépasse 0.3% (p/v) et hyper-salées lorsque la salinité est supérieure à 3.3% (p/v) (*Edgerton et Brimblecombe, 1981*).

Les environnements hyper-salins tels que les lacs hyper-salins, étangs solaires, les chotts et les sebkhas, sont largement répandus dans le monde (*Oren, 2011*). Ils constituent le plus grand écosystème de la Terre. Ils sont riches d'une variété d'organismes des trois domaines de la vie (*Kirtel et al., 2018*). La plupart des environnements hyper-salins proviennent de l'évaporation de l'eau de mer, favorisée par des débits, les températures élevées, les faibles précipitations, la faible humidité et la grande vitesse du vent (*McGenity et al., 2000*).

1.3. DIVERSITE DES ENVIRONNEMENTS SALINS

1.3.1. ENVIRONNEMENTS THALASSOHALINS

Les environnements thalassohalins (du grec thalasso, signifiant "mer") sont caractérisés par une composition ionique similaire à celle de l'eau de mer, avec des proportions comparables de cations et d'anions, dominées par le chlorure de sodium (NaCl) (*Ventosa & Arahal, 2009*). Ces milieux tirent leur origine de l'évaporation partielle ou complète de l'eau de mer (*Oren, 2002*).



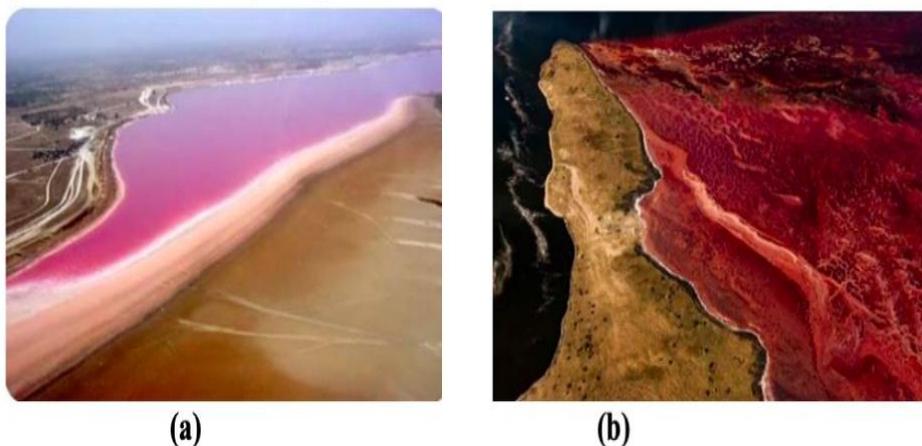
(a)

(b)

Figure 01 : Habitats thalassohalins : Chott Melghir (a) Menasria (2020), Lac de saumure au fond de la Méditerranée Est (b) © Ifermer in Khallef, 2019)

1.3.2. ENVIRONNEMENTS ATALASSOHALINS

Les environnements athalassohalins sont des milieux salins qui ne proviennent pas de l'eau de mer, mais d'autres sources hydrologiques. Leur composition ionique diffère notablement de celle des milieux marins, avec des rapports d'ions variés. Ces environnements sont généralement dominés par des ions tels que le potassium, le magnésium ou le sodium, et peuvent constituer des gisements importants de potasse, de magnésium métallique, de soude, voire de borax si les eaux sont riches en bore. Parmi les exemples notables figurent la mer Morte et les lacs alcalins sodiques d'Égypte, tels que ceux de Wadi Natrun (*Litchfield & Gillevet, 2002*).



(a)

(b)

Figure 2 : Habitats athalassohalins : Lac rosé au Sénégal (a), Lac Magadi au Kenya(b) (*in Khallef, 2019*).

1.4. LES ZONES HUMIDES SALINES

1.4.1. LES LACS SALES

Les lacs salés sont des écosystèmes aquatiques continentaux (*Donaire, 2000*) présents sur tous les continents, notamment en Asie, en Amérique du Sud, en Amérique du Nord, en Australie, en Europe et en Afrique (*Demnati et al., 2017*). Ils sont généralement isolés des mers, bien que certains aient été autrefois connectés à des environnements marins avant de s'assécher, puis d'être réalimentés par des sources d'eau non marines (*Williams, 2002*). Ces milieux uniques se trouvent principalement dans des régions arides, où les précipitations annuelles varient entre 25 et 200 mm, ou semi-arides, recevant entre 200 et 500 mm de pluie par an (*Williams, 1998*). Nombre d'entre eux sont situés dans des bassins endoréiques d'origine tectonique, caractérisés par des écoulements temporaires qui surviennent lors de fortes précipitations (*Britton et Crivelli, 1993*). L'alimentation en eau de ces lacs peut également provenir de rivières ou d'aquifères profonds, qui agissent comme exutoires naturels (*Bryant et Rainey, 2002*).

1.4.2. Sebkha

En arabe, le terme sebkha désigne des plaines salines soumises à des inondations périodiques. Dans les zones désertiques, ces dépressions ne sont temporairement remplies d'eau que lors d'épisodes pluviométriques rares. L'intense évaporation qui caractérise ces milieux entraîne la formation d'une croûte d'évaporites au fond de ces bassins. Une sebkha correspond ainsi à un bassin occupant le fond d'une dépression à forte salinité, généralement localisé dans des zones arides, et plus ou moins séparé du milieu marin (zone supratidale). Toutefois, un contact avec la mer peut subsister : soit par un mince filet d'eau en profondeur, soit par des infiltrations en surface. Dans ce dernier cas, des débordements d'eau peuvent survenir de manière périodique.

Dans les deux configurations, on observe une augmentation progressive de la salinité, une forte évaporation, la formation de saumures, et la précipitation d'évaporites — soit au fond du bassin si celui-ci est peu profond, soit sur les zones marginales lorsque la profondeur est plus importante. Les sebkhas sont principalement localisées en Afrique du Nord et au Moyen-Orient.

Tableau I : Principaux Sebkhass en Algérie (Sahli, 2021).

Nom de Sebkhass	La zone géographique
1. Salines d'Arzew 2. Sebkhass d'Oran 3. Lac Téllamine 4. Garaet Aen Djmel 5. La saline d'Oued Djemaa	Nord-ouest
5. Garaet Guellif 6. Sebkhass Ezzeemoul 7. Garaet Merhsel 8. Garaet Tarf 9. Chott Tinsilt 10. Chott Boumia 11. Chott El Beidha Hammam Essoukhna 12. Chott El Frain 13. Sebkhass Bazzar 14. Sebkhass El Hamiet 15. Chott El Hodna 16. Chott Zehrez Chergui 17. Chott Zehrez Gherbi 18. Sebkhass Sidi Bouziane	Nord-est
19. Chott Chergui 20. Sebkhass boughzoul 21. Chott Melghir 22. Chott Boudjloul 23. Chott Merouane 24. Chott Tindla 25. Chott Sidi Amrrane 26. Sebkhass Sefioune 27. Chott Oum Raneb	Le sud

28. Chott Ain El Beida

29. Sebkha El Maleh

2. LA DIVERSITE BACTERIENNE DES ENVIRONNEMENTS EXTREMES

2.1. LES BACTERIES EXTREMOTOLERANTES

2.1.1. GENERALITES

Le terme extrémotolérance a été introduit par MacElroy en 1974. Il englobe les bactéries, les archées, les champignons, certaines algues, ainsi que les virus et les protozoaires ciliés (*Xu, 2014*). La majorité des organismes extrémotolérants sont des procaryotes (*Zgonik et al., 2021*). Ce terme a été défini de différentes manières et est désormais associé à des micro-organismes vivant dans des environnements hostiles pour les mammifères (*Irwin et Baird, 2004*).

On définit les extrêmo-tolérants comme des êtres vivants aptes à survivre et se multiplier dans des écosystèmes où les conditions physiques sont extrêmes, telles que la température, la pression, le rayonnement et la géochimie (salinité, pH, potentiel redox). Les microorganismes polyextrêmo-tolérants sont capables de survivre dans plus d'un de ces environnements extrêmes (*LealDalmaso et al., 2015*).

2.1.2. PROPRIETES

À la différence de la résistance aux conditions extrêmes, l'extrémotolérance signifie que toute la machinerie cellulaire est ajustée aux environnements extrêmes et que les cellules opèrent de façon optimale dans ces contextes. Cependant, dans une certaine mesure, les cellules sont capables de réguler leurs conditions internes pour quelques paramètres tels que l'osmolarité. Ainsi, le pH à l'intérieur de la cellule des souches alcalinotolérantes sera plus bas que celui de l'environnement externe, et c'est le contraire pour les autres espèces acidotolérantes (*Querellou et Guezennec, 2010*).

Cependant, pour certains paramètres tels que la température et la pression, les conditions environnementales affectent globalement les cellules, y compris leurs membranes, leur milieu interne et l'ensemble de leurs composants cellulaires. Ces éléments cellulaires nécessitent non seulement d'être stables dans ces circonstances, mais avant tout, opérationnels. Il n'est pas toujours nécessaire que chaque biomolécule isolée et examinée dans les conditions de l'environnement externe reste stable, car le milieu interne peut

bénéficier de l'intervention de certains solutés organiques ou d'une protection au sein de complexes macromoléculaires (*Belala seif et al., 2021*).

2.1.3. CLASSIFICATION DES BACTERIES EXTREMOTOLERANTES

Les bactéries extrêmotolérantes sont catégorisées selon les conditions physico-chimiques extrêmes auxquelles ils sont capables de survivre. Par exemple, en fonction de la température, on distingue les hyperthermotolérantes, les thermo-tolérantes et les psychrotolérantes. En ce qui concerne le pH, on retrouve les acidotolérantes et les alcalinotolérantes. Quant à la salinité, les organismes adaptés sont appelés halotolérantes (*Detay et Thomas, 2018*).

- **LES BACTERIES THERMOTOLERANTES**

Les bactéries thermo-tolérantes figurent parmi les extrême-tolérantes les plus étudiés, suscitant un intérêt particulier de la communauté scientifique (*Gomes et Steiner, 2004*). Ils sont capables de se développer à des températures élevées, généralement comprises entre 41 °C et 122 °C (*Dumorné et al., 2017*). Ces organismes colonisent divers environnements à haute température, tels que les zones géothermiques terrestres, les sources hydrothermales océaniques profondes, les réservoirs pétroliers (*Rabouhi et Benbrahim, 2022*), mais aussi des milieux artificiels comme les chaudières domestiques et industrielles, les centrales électriques ou encore les systèmes de drainage minier acide.

Au cours des 150 dernières années, une grande diversité de microorganismes a été identifiée dans ces écosystèmes chauds, qu'ils soient naturels ou artificiels. Cette diversité est principalement constituée de procaryotes non photosynthétiques (*Gomri, 2019*).

L'étude des thermo-tolérantes est en grande partie motivée par leur potentiel biotechnologique. Deux grands axes d'application peuvent être distingués : l'un repose sur l'exploitation directe des organismes eux-mêmes, et l'autre sur l'utilisation de leurs biomolécules, notamment les enzymes, les protéines, les lipides, les osmolytes (thermolytes), ainsi qu'une grande variété de métabolites secondaires (*Maouchi et Medjedoub, 2020*).

- **LES BACTERIES PSYCHROTOLERANTES**

Les psychro-tolérantes, qui évoluent dans des conditions de froid extrême, présentent une grande diversité, biomasse et distribution (*Shukla et al., 2020*). Dès

1887, Forster fut le premier à signaler des microbes capables de se reproduire à 0 °C, isolés de poissons. Le terme « psychrotolérant » fut introduit par Schmidt-Nielsen en 1902 pour désigner les bactéries pouvant croître à cette température (*Pikuta et al., 2007*).

Ces organismes, dits « amoureux du froid », se développent à des températures inférieures à 5 °C, généralement autour de 0 °C, et parfois en dessous, notamment dans des milieux liquides très salés empêchant la congélation (*Detay et Thomas, 2018*). On les retrouve dans les profondeurs océaniques au-delà de 1000 mètres (entre -1 et 4 °C), dans les sédiments et eaux côtières froides (jusqu'à -1 °C), dans la banquise (jusqu'à -35 °C en hiver), ainsi que dans les glaciers et zones alpines recouvertes de neige éternelle (20 % des sols terrestres)(*Besse, 2016*).

Tous les domaines de la vie – Eucaryotes, Archées et Bactéries – ont été identifiés dans ces niches glaciaires, avec une domination bactérienne, suivie des champignons et des algues (*Ilahi et al., 2022*).

Les psychrotolérantes constituent depuis plusieurs années une ressource majeure en biotechnologie. Leurs enzymes, actives à froid, sont utilisées dans des procédés industriels nécessitant des conditions spécifiques, notamment dans les secteurs agroalimentaires, pharmaceutique, des détergents et de la fabrication du papier. Ces enzymes se distinguent par leur forte sélectivité, leur stéréospécificité et leur efficacité catalytique à basse température (<40 °C) (*Ibtissem Djinni, 2017*).

- **LES BACTERIES HALOTOLERANTES**

Les halotolérantes, dont le nom signifie « amateurs de sel » en grec, font partie des microorganismes extrémotolérantes capables de survivre et de se développer dans des milieux fortement salins (*Kumar et al., 2016*). Ces environnements hypersalins comprennent aussi bien des systèmes aquatiques (comme la mer Morte, le Grand Lac Salé, certains lacs africains, chinois et antarctiques) que des milieux terrestres ou des produits salés (aliments salés, peaux, sel marin ou gemme) (*Ventosa et al., 2014*).

On retrouve les halotolérants dans les trois grands domaines du vivant : les Archées, les Bactéries et les Eucaryotes, bien que la majorité appartiennent aux procaryotes (*Menasria, 2020*).

Récemment, l'intérêt pour ces microorganismes a augmenté dans le domaine de la biotechnologie industrielle, en raison de leurs nombreux avantages : faible consommation d'eau douce et d'énergie, production continue, et investissements initiaux réduits. En particulier, leurs enzymes – comme les amylases, lipases et cellulases – sont prometteuses

pour des applications industrielles variées grâce à leur résistance à des conditions extrêmes (Xie *et al.*, 2017).

- **LES BACTERIES ACIDOTOLERANTES**

Les acidotolérantes sont des microorganismes dont la croissance peut être à un pH inférieur à 4. Leur étude remonte au début des années 1900, avec la découverte par Waksman et Joffe d'une bactérie capable de croître dans de l'acide sulfurique dilué, qu'elle génère en oxydant le soufre (Johnson et Quatrini, 2020).

Ces microorganismes colonisent des environnements naturels et artificiels extrêmement acides, tels que les lacs acides, les sources hydrothermales, les sols sulfatés, les régolithes, les minerais sulfurés, ainsi que les sites miniers de métaux et de charbon (Johnson et Schippers, 2017).

Malgré ces conditions hostiles, les acidotolérantes présentent une grande diversité phylogénétique (Christel, 2018).

Les acidotolérantes jouent un rôle essentiel dans les procédés de bio-extraction des métaux à partir de minéraux sulfurés et dans la bioremédiation des sols et eaux pollués par les métaux (Orellana *et al.*, 2018). Leurs enzymes, stables en milieux acides, sont d'un grand intérêt pour des applications industrielles, notamment dans la production de biocarburants et d'éthanol (Dumorné *et al.*, 2017).

- **LES BACTERIES ALCALOTOLERANTES**

Les alcalotolérantes sont des microorganismes capables de croître à un pH élevé, généralement entre 9 et 12, mais dont la croissance est fortement réduite à des pH proches de la neutralité (Horikoshi, 1999). Ces organismes, sont présents dans une grande diversité d'écosystèmes, y compris ceux dont le pH global n'est pas particulièrement alcalin (Grant *et al.*, 1990).

Ils sont souvent exposés à des conditions environnementales combinées : forte alcalinité, salinité élevée et températures extrêmes, selon les caractéristiques géologiques, climatiques et géographiques (Mei, 2016). Parmi les environnements typiques de ces microorganismes, on trouve plusieurs lacs alcalins et hypersalins, comme le lac Magadi au Kenya, les lacs de la vallée du Rift, les lacs Wadi Natrun en Égypte, ainsi que Mono Lake (Californie) et Big Soda Lake (Nevada, États-Unis) (Oren, 2002).

Le premier micro-organisme identifié pour sa tolérance aux milieux alcalins fut *Streptococcus faecalis* (aujourd'hui *Enterococcus faecalis*), décrit en 1928. Depuis, de

nombreux microorganismes basophiles, qu'ils soient photosynthétiques ou chimiosynthétiques, ont été découverts dans des environnements alcalins, aussi bien aérobies qu'anaérobies (**Johnson et Schippers, 2017**).

Les communautés microbiennes alcalotolérantes les plus étudiées comprennent les cyanobactéries filamenteuses (*Spirulina, Anabaenopsis, Arthrospira*) et les bactéries pourpres phototrophes (*Ectothiorhodospira, Halorhodospira*) (**Ahmed Mehdi, 2014**).

En biotechnologie, les alcalotolérantes représentent une ressource précieuse. Non seulement ils produisent des biomolécules d'intérêt industriel, mais leurs caractéristiques physiologiques – notamment leur capacité à fonctionner dans des conditions extrêmes – les rendent attrayants pour des applications commerciales variées (**Ulukandi et Digrak, 2002 ; Lebre Pedro et Cowan, 2019**).

2.2. APPLICATION BIOTECHNOLOGIQUE DES BACTERIES EXTREMO-TOLERANTES

L'industrie, la biotechnologie, la bio-exploitation minière, la médecine et la production d'énergie ont intégré les micro-organismes extrême-tolérants dans leurs procédés. Ces organismes représentent en effet une alternative précieuse aux enzymes mésophiles, notamment grâce à leur stabilité dans des conditions extrêmes (**Kaur et al., 2019**).

On distingue deux grands types d'applications :

1. L'utilisation directe des micro-organismes extrême-tolérants, notamment dans :

- La bioremédiation : ensemble de techniques qui visent à restaurer un environnement pollué en stimulant les populations microbiennes indigènes ou en y introduisant des micro-organismes adaptés.

- La biolixiviation : procédé utilisant des micro-organismes pour extraire les métaux à partir de minerais, particulièrement dans l'exploitation minière (**Salem, 2019**).

2. L'utilisation indirecte, qui repose sur l'exploitation des biomolécules produites par ces micro-organismes. Ces molécules sont capables de fonctionner de manière optimale dans des conditions physico-chimiques extrêmes. Elles se caractérisent par une grande stabilité et offrent de nombreuses applications industrielles. Parmi ces biomolécules, on trouve :

- des protéines,
- des enzymes extrêmophiles,
- des lipides,
- des polymères,
- des extrêmolytes (molécules protectrices),

- des pigments naturels,
- et même des biocarburants (*Sahli, 2021*).

**Identification
physico-chimique des
bactéries
extrémotolérantes**

1. CRITERES MORPHOLOGIQUES

Il s'agit deux groupe macromorphologie et micromorphologie :

1.1. L'OBSERVATION MACROMORPHOLOGIQUE

Consiste à examiner les colonies bactériennes cultivées sur un milieu solide. Les caractéristiques telles que la forme, la couleur, le relief, la texture, la brillance ou encore la production de pigments sont des critères fondamentaux pour différencier les genres bactériens. Ces paramètres phénotypiques permettent une première orientation taxonomique (*Wulandari et al., 2024 ; Maldonado Desena et al., 2022*).

1.2. L'OBSERVATION MICROSCOPIQUE APRES COLORATION DE GRAM

Permet de distinguer les bactéries Gram positif et Gram négatif, selon la structure de leur paroi cellulaire. Cette technique révèle également la morphologie des cellules et leur arrangement (isolées, en chaînes, en amas...). Elle reste une méthode rapide, économique et essentielle, même pour les bactéries vivant dans des environnements extrêmes (*Muchhadiya et al., 2024*).

2. IDENTIFICATION CHIMIQUE

2.1. LA GALERIE API 20E

Une galerie API (Appareils et Procédés d'Identification) est un ensemble de cupules prêts à l'emploi permettant l'identification de micro-organismes par la réalisation rapide et facile de tests biochimiques miniaturisés. Créée en 1970 par le Docteur Buisnière, le pharmacien Cinquabre, Paul & Pierre Montagnon et Henri Labruyère, la société API a par la suite été rachetée par la société BioMérieux (*JOFFIN, 1998*).

2.2. LA CATALASE

Une catalase est une oxydoréductase qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène : $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$. La présence de l'enzyme se traduit par un dégagement immédiat des bulles gazeuses (Louis Jacques,1811).

2.3. L'OXYDASE

Il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase, dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui assure le transfert des électrons sur l'oxygène ou sur un autre oxydant minéral. Le principe consiste à déposer une colonie de la souche sur un disque imprégné du réactif oxalate de N-diméthyl paraphénylène-diamine de couleur rose. La présence de l'enzyme se traduit par un virage de la couleur rose vers un violet noirâtre (*Louis-Antoine ; 1810*).

2.4. MANNITOL MOBILITE

La mobilité de la souche est déterminée sur le milieu semi solide de mannitol-mobilité. La souche estensemencée par piqûre centrale. Après incubation pendant 72 heures à 37°C, la mobilité se traduit par l'envahissement du milieu à partir de la piqûre d'inoculation. (*Guiraud, 1998*).

2.5. PIGMENT MELANOIDE

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

3. IDENTIFICATION PHYSIQUE

3.1. LA TOLERANCE AU PH

La plupart des microorganismes halotolérants sont neutrophiles et alcalophiles. Les acidotolérants croissent mieux à des pH de 2 à 4 tandis que les alcalinotolérants croissent à des pH de 8 à 10 en utilisant des carbonates pour maintenir le pH (*Al-Rubaye et al., 2017*).

3.2. LA TOLERANCE A LA TEMPERATURE

La plupart des microorganismes 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 bactéries 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. LA TOLERANCE A LA SALINITE

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 halotolérantes sont des halophiles modérées et croissent à une concentration de 3 à 15 % de NaCl (*Kumar et Tiwari, 2019*).

4. IDENTIFICATION ENZYMATIQUE DES BACTERIES EXTREMOTOLERANTES

4.1. CASEINASE

Le test de caséinase permet de détecter les protéases extracellulaires capables d'hydrolyser la caséine, une protéine du lait. Historiquement appliqué aux bactéries lactiques et au genre *Bacillus*, il repose sur la culture sur gélose contenant 1 % de caséine : en présence de protéases, un halo transparent apparaît autour des colonies indiquant la clivage protéolytique. Chez les bactéries extrémophiles, cette enzyme révèle leur aptitude à dégrader des protéines complexes dans des milieux pauvres en nutriments, participant à la libération d'acides aminés. Une étude récente a montré que *Janthinobacterium licidum*, isolé de sols polaires, sécrète une protéase adaptée au froid, suggérant une grande plasticité métabolique (*Kim et al ; 2022*).

4.2. GELATINASE

Ce test, utilisé depuis les années 1920 pour l'identification et la virulence bactérienne, révèle l'activité des gélatinases, qui hydrolysent la gélatine (dérivée du collagène). Sur gélose enrichie en gélatine à 0,4 %, l'hydrolyse crée une zone de liquéfaction apparaissant clairement après précipitation (sulfate d'ammonium). Il met en évidence des enzymes de dégradation des protéines structurales impliquées dans la mobilité ou l'invasion cellulaire. Une analyse de souches psychrotrophes a montré que plusieurs *Pseudomonas* et *Serratia*, isolées de lait, produisent des gélatinases thermostables (~45 kDa), suggérant une survie adaptative dans des environnements froids (*Baglinière et al ; 2021*).

4.3. TWEEN 80 (LIPASE/ESTERASE)

Basé sur la technique de Jaeger & Küker (1987), ce test détecte l'hydrolyse du Tween 80 (ester polyoxyéthylène sorbitan) par des lipases/estérases. En présence de ces enzymes, les acides gras libérés forment un complexe blanc avec Ca^{2+} ; sur milieu

Rhodamine B, la réaction produit une fluorescence orangée sous UV. Chez les extrémophiles, ces enzymes lipolytiques sont essentielles pour dégrader les graisses et hydrocarbures dans des habitats froids ou salins. Une étude récente a caractérisé une lipase halophile thermostable de *Pseudomonas* sp. Provenant d'un bassin marin extrême, démontrant une activité optimale à 50 °C et 4 M NaCl (*Salwoom et al ; 2020*).

4.4. HYDROLYSE DE L'AMIDON (AMYLASE)

Ce protocole historique (*Milchner ; années 1930*) est basé sur la digestion de l'amidon sur gélose à 1 %, révélée par un lavage au Lugol : les halos clairs indiquent une activité amylolytique. Les amylases extrémophiles permettent à ces micro-organismes de métaboliser les polysaccharides complexes dans les milieux végétaux ou marins. Des amylases extrémophiles thermo-halophiles, isolées d'un four de briques algérien, ont démontré une stabilité et une efficacité remarquables à haute température, confirmées par zone claire après révélation au Lugol (*Ullah et al ; 2021*).

4.5. UREASE

Depuis 1904 (Dekker & McKee), ce test sur milieu contenant de l'urée et un indicateur de pH (rouge de phénol) révèle la libération d'ammoniac (NH₃) par l'uréo-hydrolyse, entraînant un virage colorimétrique (jaune → fuchsia). Chez les extrémophiles, l'uréase contribue à l'adaptation dans des environnements acides et à la précipitation de carbonates (utilisé en géotechnique pour le MICP). Récemment, *Sporosarcina pasteurii* isolée d'un désert a démontré une activité uréasique élevée, confirmée par un virage rapide au fuchsia, ce qui en fait un excellent candidat pour des applications en ingénierie environnementale (*Sun et al ; 2024*).

4.6. PECTINASE

Actif depuis les années 1940, ce test détecte l'hydrolyse de la pectine (polysaccharide des parois végétales). Sur gélose à 0,5 % de pectine, la coloration met en évidence des halos clairs autour des colonies dégradantes. Les pectinases extrémophiles des milieux salins ou acides sont précieuses pour l'interaction plante–microbe et l'industrie du jus. Une étude a mis en évidence une pectinase halotolérante à pH 5 issue d'une bactérie halophile, avec une zone claire de 15 mm après 48 h à 30 °C (*Meglali & Ghellai ; 2024*).

4.7. CHITINASE

Formalisé dans les années 1960, ce test utilise une gélose enrichie en chitosane ou chitine : l'hydrolyse entraîne un halo clair détectable après coloration ou changement de pH. La chitinase est essentielle pour dégrader la chitine de crustacés ou insectes. Une publication de 2024 sur *Curtobacterium* sp. marine antarctique décrit une chitinase poly-fonctionnelle optimisée par ingénierie, active à 4 °C, et montrant une inhibition fongique significative contre *Aspergillus* spp., ouvrant des applications en biocontrôle (*Vasquez et al., 2024*).

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. SITE DE PRELEVEMENT DE L'ECHANTILLON

Dans ce travail, qui met l'accent sur la valeur des zones humides algériennes, nous nous sommes concentrés sur une étude microbiologique de la saline d'Oued Djemaa, localisée dans la wilaya de Relizane, au nord-ouest de l'Algérie (figure 03).

L'unité d'Oued Djemaa est un site de fabrication et de vente de sels (destinés à l'alimentation et à l'industrie). Cette unité a été établie et mise en service en 1943 en tant que société anonyme sous le nom de Salins de Ferrey. Elle est sous la dépendance de l'ENASEL depuis 1983(Bennabi *et al.*, 2015).

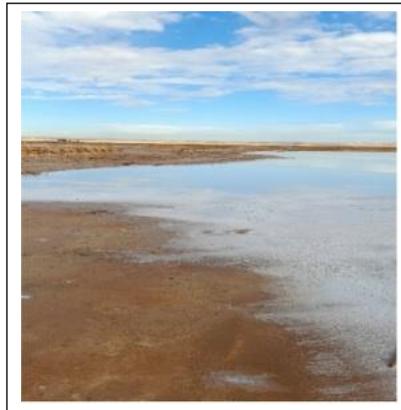


Figure 03 : Site de saline Oued Djemaa-Relizane



Figure 04 : Situation géographique de la saline d'Oued Djemaa

1.1. METHODE DE PRELEVEMENT

Le 24/02/2025, un échantillon de la saline d'Oued Djemaa a été prélevé à une profondeur de 10 cm, les premiers 5 centimètres en surface ont été écartés. Chaque prélèvement de sol a été effectué avec une spatule stérilisée et transféré dans un récipient en verre aseptisé. Par ailleurs, des prélèvements d'eau ont aussi été réalisés le même jour en utilisant des bouteilles stériles.

Tous les échantillons, qu'ils soient de sédiment ou d'eau, ont été acheminés au laboratoire à température réfrigérée avant d'être soumis à une analyse microbiologique dans les 24H qui suivent les prélèvements.

2. PRETRAITEMENT DES ECHANTILLONS

2.1 CAS DU SEDIMENT

Afin d'optimiser l'isolement des actinomycètes, en particulier ceux présentant une extrêmotolérance, divers procédés ont été appliqués aux échantillons de sol. Certains n'ont subi aucun prétraitement, tandis que d'autres ont été soumis à un traitement physique consistant en une élévation de la température à 50°C pendant une heure, dans le but de réduire la population de bactéries non sporulantes et de favoriser la germination des spores thermorésistantes des actinomycètes (**Tiwari & Gupta, 2012**).

Un traitement chimique au CaCO₃ a aussi été appliqué pour rehausser le pH et stimuler la croissance des actinomycètes alcalotolérantes, généralement liés à des conditions extrêmes (**Hayakawa & Nonomura, 1987**).

2.2. CAS DE L'EAU

Par contre, les échantillons d'eau ont été manipulés sans aucune altération, en suivant des techniques traditionnelles d'isolement en milieu liquide (**El-Nakeeb & Le chevalier, 1963**).

3. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES SOUCHES

Quatre types de milieux de culture sélectifs sont employés pour l'isolement des actinobactéries parmi les divers milieux sélectifs. La composition de ces milieux de culture est présentée en Annexe.

***Milieu GLM** (gélose à l'extrait de levure et l'extrait de malt) (**Kitouni et al. 2005**).

***Milieu ISP2** (International *Streptomyces* Project) (**Ara et al., 2012**).

***Milieu GN (Glucose-NaCl)** (**Hayakawa & Nonomura, 1987**).

***Milieu Bennett** (gélose de Bennett) (**Shirling & Gottlieb, 1966**).

***Milieu à l'asparagine** (**Ruan et al., 2005**).

Dans certains cas, l'eau distillée utilisée pour la préparation des milieux a été partiellement remplacée par un mélange d'eau distillée et d'eau de sebkha, prélevée de la saline d'Oued Djemaa, région d'origine des échantillons.

3.1. Technique d'isolement et conditions d'incubation

Afin d'isoler et de dénombrer les différentes espèces bactériennes présentes dans nos échantillons de sédiment et d'eau, nous avons utilisé la méthode des suspensions-dilutions (**Badji et al., 2005**). Cette méthode consiste à prélever 10 g de sol et à les introduire dans 100 ml d'eau physiologique stérile afin d'obtenir une suspension mère. À partir de celle-ci, des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-5} sont préparées. Ensuite, 0,1 ml de chaque dilution est étalé sur des milieux de culture appropriés, préalablement stérilisés et coulés dans des boîtes de Pétri stériles de 9 cm de diamètre. Les boîtes ensemencées sont incubées à 28 °C pendant une période de 7 à 15 jours (**Boussaber et al., 2012**).

3.2. Purification des souches

À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, un inoculum est prélevé à partir des colonies présentes sur le milieu d'isolement, puis ensemencé par stries sur le même type de milieu. Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention de cultures pures. La pureté des isolats est vérifiée par des observations microscopiques directes après chaque repiquage (**Boussaber et al., 2012**). Il s'agit d'une méthode standard généralement utilisée pour la purification de toutes les espèces bactériennes, y compris les actinomycètes, car elle repose sur des étapes rigoureuses permettant d'obtenir des isolats purs.

4. IDENTIFICATION DES SOUCHES

4.1.ÉTUDE DES CARACTERES MORPHOLOGIQUES

4.1.1. ÉTUDE MACROMORPHOLOGIQUE

Consiste à déterminer la couleur du mycélium aérien et de substrat, la production de pigments solubles ainsi que la croissance et la sporulation et cela sur différents milieux de culture (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

4.1.2 . ETUDE MICROMORPHOLOGIQUE

***ÉTAT FRAIS**

Ce type d'observation permet d'apprécier par le biais du microscope optique :

Ø **La morphologie**

Ø **La mobilité**

***COLORATION DE GRAM**

Selon cette analyse de coloration, on peut déterminer le Gram des bactéries comme étant positif ou négatif.

*L'observation au microscope optique avec un objectif à immersion (×100) permet d'identifier certaines caractéristiques morphologiques à partir de la préparation microscopique, telles que la forme des filaments bactériens et la présence ou l'absence de spores isolées (**William et al., 2010**). La détermination du caractère Gram positif ou négatif des souches a été réalisée à l'aide de la technique classique de coloration de Gram développée par Gram en 1884 (**Gram, 1884**).

5-IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE

5.1. IDENTIFICATION PAR GALERIE API 20

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

Dans les microtubes, une suspension bactérienne de la souche effectuée en API medium à partir d'une culture de 18 heures sur Bouillon nutritif milieu Isp2 liquide (équivalent à 0,5 McFarland) estensemencée. Après incubation 24 heures à 37°C pour les bactéries et à 30°C 2-3 jours pour les actinomycètes, les réactions se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. L'interprétation des résultats se réfère au catalogue joint avec la plaque. (**JOFFIN, 1998**).

5.2. LA RECHERCHE DE LA CATALASE

Il s'agit de la recherche de l'enzyme responsable de l'élimination du peroxyde d'hydrogène ; la catalase. Le principe consiste à mettre en contact une colonie de la souche avec une goutte d'eau oxygénée H₂O₂. La présence de l'enzyme se traduit par un dégagement immédiat des bulles gazeuses (**Louis Jacques, 1811**).

5.3. LA RECHERCHE DE L'OXYDASE

Il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase, dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui assure le transfert des électrons sur l'oxygène ou sur un autre oxydant minéral. Le principe consiste à déposer une colonie de la souche sur un disque imprégné du réactif oxalate de N-diméthyl paraphénylène-diamine de couleur rose. La présence de l'enzyme se traduit par un virage de la couleur rose vers un violet noirâtre (**Louis-Antoine ; 1810**).

5.4. MANNITOL MOBILITE

La mobilité de la souche est déterminée sur le milieu semi solide de mannitol-mobilité. La souche estensemencée par piqûre centrale. Après incubation pendant 72 heures à 37°C, la mobilité se traduit par l'envahissement du milieu à partir de la piqûre d'inoculation (**Guiraud, 1998**).

5.5. RECHERCHE DE PIGMENT MELANOIDE

Le pigment mélanoides est déterminé par la couleur diffusée sur le milieu ; la souche estensemencée sur les milieux : ISP1-ISP2-ISP3-ISP4-ISP5-ISP6-ISP7 (**Sricharoen et al., 2023**).

6. IDENTIFICATION PHYSIQUE

6.1. LA TOLERANCE A LA TEMPERATURE

Les isolats ont étéensemencés sur le milieu gélosé Isp2 pour les actinobactéries et la gélose nutritive pour les bactéries à raison de 3 Boîtes de Pétri par souche pour chaque température d'incubation. La croissance a été notée (faible, moyenne, bonne et très bonne) après 2-4 jours d'incubation à 4°C, 30°C, 37°C, 50°C (**Gopalakrishnan et al., 2014**).

6.2. LA TOLERANCE AU PH

Les isolats jeunes ont étéensemencés sur le milieu gélosé Isp2 et la gélose nutritive ajusté aux différentes valeurs de pHs (4, 7, 9). Les boîtes de Pétri ont été incubées à (30°C/3-

5jours) et à (37°C/24heurs). Après incubation, la croissance a été notée (faible, moyenne, bonne et très bonne) (**Gopalakrishnan et al., 2014**).

6.3. LA SALINITE

Le milieu ISP2 et la GN supplémenté de NaCl aux concentrations de (5%, 10%, 15%) (P/V) ont étéensemencés par des cultures jeunes, la croissance a été notée (faible, moyenne, bonne et très bonne). La tolérance maximale au chlorure de sodium correspond à la plus grande concentration présentant une croissance (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

7.ÉTUDE DES CARACTERES ENZYMATIQUES

7.1. RECHERCHE DES PROTEASES

7.1.1. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE CASEINOLYTIQUE

L'activité caséinase a été évaluée sur un milieu solide supplémenté avec 5 % de lait écrémé. La souche étudiée a étéensemencée par striation en surface, puis incubée à 30 °C. Après une période d'incubation de sept jours, l'apparition d'une zone claire autour des colonies signale l'hydrolyse de la caséine présente dans le milieu (**Raval et al., 2012 ; Roy et al ; 2014**).

7.1.2. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE GELATINOLYTIQUE

L'activité gélatinase a été recherchée sur un milieu nutritif solide contenant 12 % de gélatine , réparti dans des tubes (Milieu de gélatine nutritive) ,les tubes ont été stérilisés puisensemencé par piqure en profondeur à l'aide d'une anse droite avec la souche bactérienne à tester et incubé à 30 °C pendant une période allant de 5 à 14 jours selon la vitesse de croissance de la souche (**Larpent et Larpent Ghourgoud,1985**). Après incubation, les tubes ont été placés au réfrigérateur (4°C) pendant 30 minutes. La liquéfaction du milieu après ce refroidissement indique une hydrolyse de la gélatine, traduisant la production d'une gélatinase par la souche. Si le milieu reste solide, le test est considéré comme négatif.

7.2. RECHERCHE DES LIPASES

7.2.1. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE LIPOLYTIQUE (TWEEN 80)

Pour évaluer l'hydrolyse du polyoxyéthylène sorbitan monoooléate (Tween 80), 10 gouttes de cette substance, préalablement stérilisée par autoclave, sont incorporées dans 25 ml d'un milieu de culture préparé avec les composants suivants : 10 g de peptone bactériologique, 5 g de chlorure de sodium, 0,1 g de chlorure de calcium, 25 g d'agar, complétés avec 1000 ml d'eau distillée. Lorsqu'une souche est capable d'hydrolyser le Tween 80, un halo opaque se forme autour de ses colonies, en raison de la précipitation des acides gras libérés (**Marchal & Bourdon, 1973**).

7.3. RECHERCHE DES SUCRES

7.3.1. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE AMYLOLYTIQUE

Pour tester l'hydrolyse de l'amidon, 2 g d'amidon soluble sont incorporés dans 200 ml de milieu nutritif à base d'agar. Après stérilisation par autoclavage, le milieu est réparti dans des boîtes de Pétri stériles. L'évaluation se réalise quotidiennement en ajoutant du lugol sur la surface des boîtes. Le milieu prend une coloration bleue partout sauf aux endroits où l'amidon a été dégradé (**Gordon et al ; 1974, Marchal et Bourdon ; 1973**).

7.4. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE UREOLYTIQUE (UREE HYDROLASE)

L'activité uréase des bactéries extrêmophiles a été évaluée en utilisant le milieu FERGUSSON (milieu urée-indole) distribué en tubes. Chaque tube a été ensemencé de manière abondante avec une culture jeune de la souche à tester, à l'aide d'une anse stérile. Les tubes ont ensuite été homogénéisés par agitation au vortex, puis incubés à 30 °C.

Les résultats ont été observés après 24 heures d'incubation et suivis jusqu'au dixième jour. La présence d'une uréase active est indiquée par l'hydrolyse de l'urée en ammoniac (NH₃), ce qui entraîne une augmentation du pH et provoque un changement de couleur de l'indicateur, qui vire au rouge violacé (**Joffin et Leyral ; 2006**).

7.5. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE PECTINOLYTIQUE

L'activité pectinase a été évaluée en cultivant les souches sur un milieu solide, réparti dans des boîtes de Pétri. Après ensemencement, les cultures ont été incubées à 30 °C pendant sept jours. À l'issue de cette période, les boîtes ont été recouvertes d'une solution d'acétate de

cuire à 10 % durant 15 minutes. L'apparition d'un halo clair autour des colonies traduit l'hydrolyse de la pectine et révèle une activité pectinolytique (**Hankin et al., 1971**).

7.6. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE CHITINOLYTIQUE

L'activité chitinase a été évaluée en utilisant un substrat naturel composé de carapaces de crevettes. Les carapaces ont été soigneusement lavées, séchées puis broyées en une poudre fine(Figure5).

Ensuite, la capacité d'un isolat à dégrader la chitine est réalisée en le cultivant sur un milieu contenant de la chitine comme seule source de carbone. Après incubation, l'activité chitinolytique est mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour des colonies, traduisant l'hydrolyse de la chitine en ses monomères. Ce test repose sur la dégradation enzymatique de la chitine par des chitinases produites par l'isolat (**Hsu et Lokwood, 1975**).

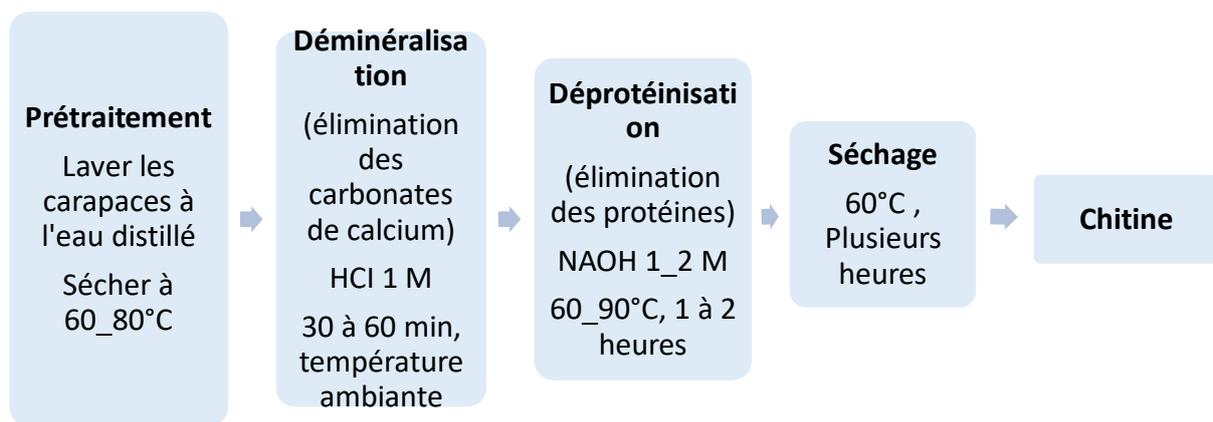


Figure 05 : Procédé d'Extraction de la Chitine à partir des Carapaces de Crevettes

Résultats et discussions

1. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE :

1.1. INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE SUR LA DIVERSITE DES SOUCHES ISOLEES A PARTIR DE LA SEBKHA DE OUED DJEMAA :

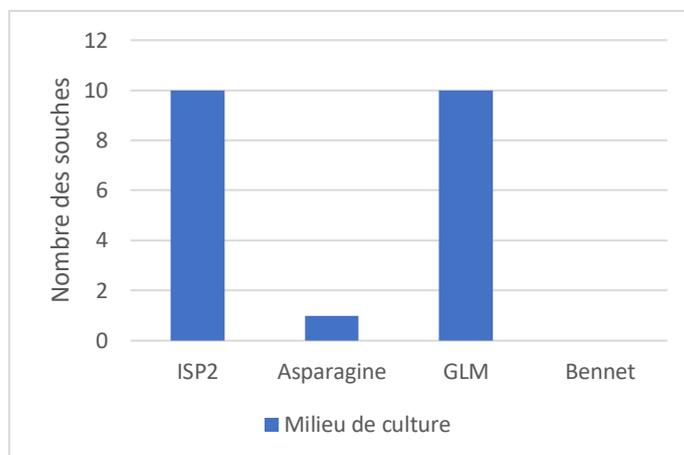


Figure 06 : Distribution des isolats selon le milieu de culture

Les milieux ISP2 et GLM se sont révélés les plus efficaces pour l'isolement de bactéries extrêmotolérantes issues de la sebkha d'Oued Djemaa, chacun ayant permis d'isoler 10 souches bactériennes. En revanche, les milieux à base d'asparagine et Bennett ont montré un faible voire une absence d'efficacité (figure ?). Une seule souche présentant des caractéristiques d'actinomycètes a été isolée, ce qui pourrait s'expliquer par leur faible abondance dans les environnements hypersalins ou par une inadéquation des milieux de culture utilisés (*Oren, 2011 ; Mohammadipanah & Wink, 2016 ; Okoro et al., 2009*). Ces résultats soulignent la nécessité d'optimiser les milieux et les conditions de culture pour favoriser l'isolement de bactéries d'intérêt, notamment les actinomycètes.

1.2. PURIFICATION

La purification représente une étape clé préalable à toute identification bactérienne. Cette procédure vise à obtenir des colonies bien distinctes et isolées, condition essentielle pour garantir une identification précise et fiable. Les photographies ci-après présentent les résultats de la purification de certaines souches de bactéries extrêmotolérantes isolées à partir de la sebkha d'Oued Djemaa, cultivées sur les milieux ISP2, GLM et GN (figure 6).

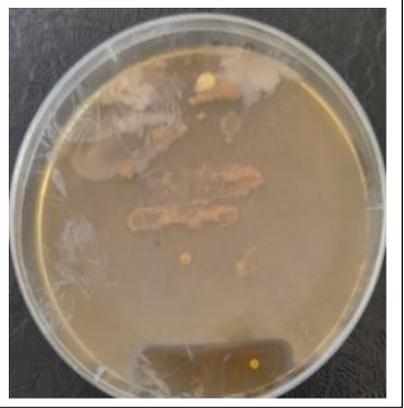




Figure 07 : Photographie de neuf souches extrêmotolérants (1, 2, 5, 7, 11, 12, 14, 17,18) isolées de la Sebkh

1.3. IDENTIFICATION MACROMORPHOLOGIQUE

Tableau II : Aspect macroscopique et caractères cultureux de quelques colonies isolées à partir des échantillons de la sebkh d'Oued Djema

Numéro de la souche	Description microscopique à l'état frais	Description microscopique après coloration de Gram
A1	Bacilles fins filamenteux, allongés et légèrement incurvés, mobile	Gram +
A2	Filaments longs et fins avec fragmentation en bacilles courts	Gram +
A3	Bacilles droits, légèrement mobiles	Gram -
A4	Très petits coque immobiles, regroupés en amas	Gram +
A5	Très petits cocci immobiles, largement dispersés dans le champ	Gram +
A6	Très petits bacilles, isolés ou rassemblés en petit amas (3 à 4 cellules), très mobiles	Gram +
A7	Cocci très nombreux, bien dispersés	Gram +
A8	Cocci alignés en bandes parallèles, très denses	Gram +
A9	Coques isolés ou rassemblés en deux ou en chaînettes, mobiles	Gram +

A10	Petits Coque, répartis en amas irréguliers	Gram -
A11	Coccis ovoïdes, en chainettes, immobiles	Gram +
A12	Petits Coccis isolés ou rassemblés en amas	Gram +
A13	Filaments ramifiés immobiles	Gram +
A14	Bâtonnets isolés, parfois incurvés, de tailles différentes	Gram -
A15	Très petits coque immobiles, regroupés en amas	Gram +
A16	Coccis très nombreux, bien dispersés	Gram +
A17	Coques isolés ou regroupés en amas	Gram +
A18	Coccis isolés, de différentes tailles et de différentes épaisseurs	Gram -
A19	Très petits bacilles, isolés, de différentes tailles et de différentes épaisseurs	Gram -
A20	Coccis isolés ou rassemblés en amas ou en chainettes, Immobiles	Gram +
A21	Coccis isolés, en paires, en Chainettes	Gram -

Parmi les 21 souches bactériennes isolées et purifiées, 19 ont été identifiées comme bactéries extrêmotolérantes et 1 comme actinomycètes présumé. Après une incubation de 30 jours à 30 °C, une souche (A1) a présenté un aspect macroscopique caractéristique des actinomycètes : des colonies d'aspect poudreux ou rugueux, bien incrustées dans le milieu de culture utilisé (Tableau 02).

Sur le plan morphologique, la majorité des colonies observées étaient de forme circulaire, et la plupart se présentaient sous forme punctiforme. La couleur dominante observée chez les bactéries extrêmotolérantes était le beige, notée chez 7 des 21 isolats.

1.4. IDENTIFICATION MICROMORPHOLOGIQUE

Les résultats des observations microscopiques réalisées à l'état frais et après coloration de Gram des bactéries extrémotolérants sont mentionnés dans le tableau 03 et la figure 15.

Tableau III : Description microscopique des 21 souches extrémotolérants isolées de la Sebkh

Numéro de la souche	Description microscopique à l'état frais	Description microscopique après coloration de Gram
A1	Bacilles fins filamenteux, allongés et légèrement incurvés, mobile	Gram +
A2	Filaments longs et fins avec fragmentation en bacilles courts	Gram +
A3	Bacilles droits, légèrement mobiles	Gram -
A4	Très petits coque immobiles, regroupés en amas	Gram +
A5	Très petits coque immobiles, largement dispersés dans le champ	Gram +
A6	Très petits bacilles, isolés ou rassemblés en petit amas (3 à 4 cellules), très mobiles	Gram +
A7	Coque très nombreux, bien dispersés	Gram +
A8	Coque alignés en bandes parallèles, très denses	Gram +
A9	Coques isolés ou	Gram +

	rassemblés en deux ou en chainettes, mobiles	
A10	Petits Coque, répartis en amas irréguliers	Gram -
A11	Coques ovoïdes, en chainettes, immobiles	Gram +
A12	Petits Coques isolés ou rassemblés en amas	Gram +
A13	Filaments ramifiés immobiles	Gram +
A14	Bâtonnets isolés, parfois incurvés, de tailles différentes	Gram -
A15	Très petits coque immobiles, regroupés en amas	Gram +
A16	Coque très nombreux, bien dispersés	Gram +
A17	Coques isolés ou regroupés en amas	Gram +
A18	Coque isolés, de différentes tailles et de différentes épaisseurs	Gram -
A19	Très petits bacilles, isolés, de différentes tailles et de différentes épaisseurs	Gram -
A20	Coques isolés ou rassemblés en amas ou en chainettes, Immobiles	Gram +
A21	Coque isolés, en paires, en Chainettes	Gram -

Parmi les 21 bactéries extrémotolérants isolées et choisies, 15 d'entre elles (71%) étaient Gram positif tandis que 6 étaient à Gram négatif (29%) (voir Figure 05).

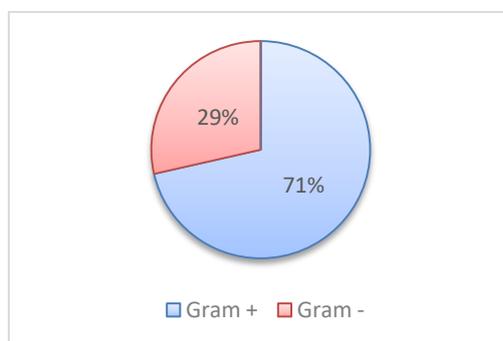


Figure 08 : Répartition des bactéries extrémotolérants selon le type de Gram.

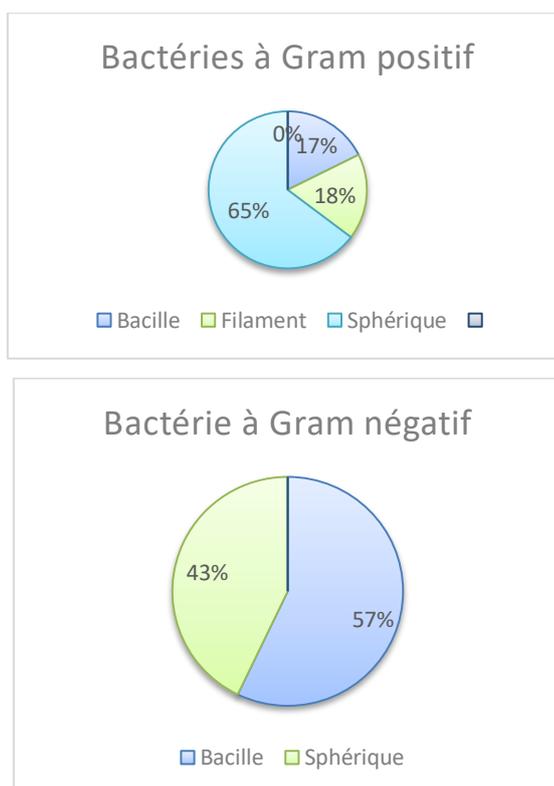


Figure 09 : Répartition des bactéries extrémotolérantes selon les différentes formes cellulaires.

L'observation microscopique des souches isolées de la sebkha d'Oued Djemaa révèle une nette prédominance de bactéries Gram positives, en majorité sous forme de coques. Cette abondance est probablement liée à leur paroi cellulaire épaisse, riche en peptidoglycane, qui leur confère une résistance accrue aux conditions extrêmes telles que la salinité, la sécheresse

ou les rayonnements UV (Reverdy et al., 2024). À l'inverse, les bactéries Gram négatives, à paroi plus fine, sont généralement plus sensibles à ces stress.

Les coques observées étaient soit isolées, soit en paires ou en chaînettes, suggérant des genres halotolérants comme *Halobacillus* ou *Virgibacillus*. Deux souches bacillaires Gram positives (souches 1 et 6) pourraient appartenir au genre *Bacillus*, reconnu pour sa sporulation et sa résistance en milieux extrêmes.

Parmi les isolats, deux souches filamenteuses ont été identifiées comme des actinomycètes. L'une d'elles présentait une colonie grisâtre avec un pigment rouge diffusible, ce qui est très caractéristique du genre *Streptomyces*, en particulier d'espèces halotolérantes comme *S. coelicolor* ou *S. griseus*, bien connues pour leur production de métabolites bioactifs en milieu salin (Menasria et al., 2022 ; Vahidi et al., 2023). Cette observation suggère un potentiel biotechnologique intéressant, notamment en matière de production d'antibiotiques ou d'enzymes.

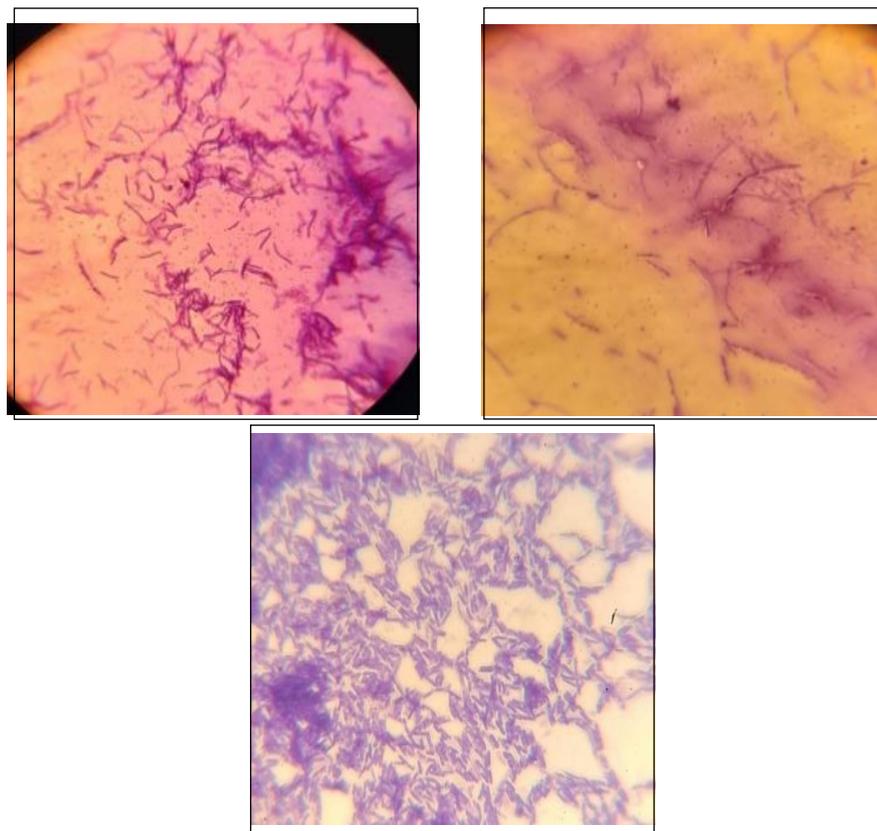
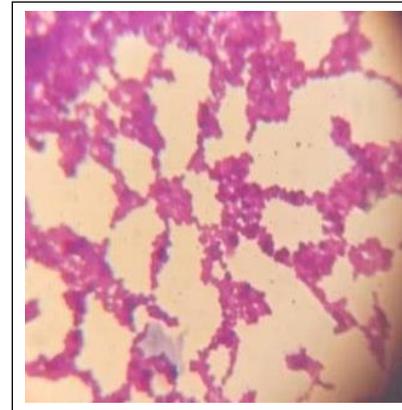
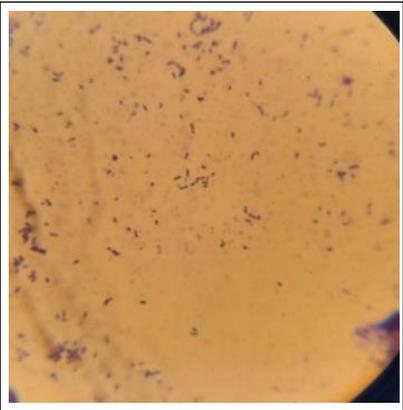
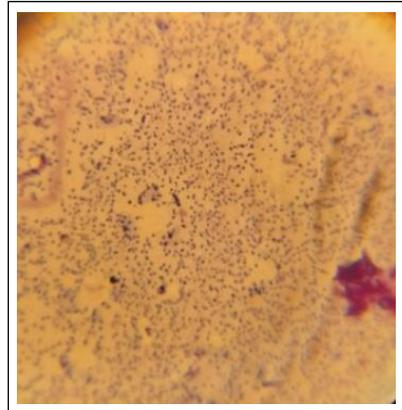
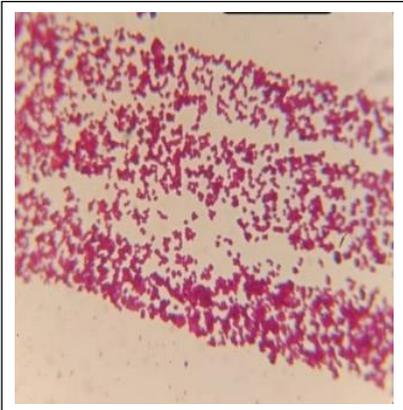
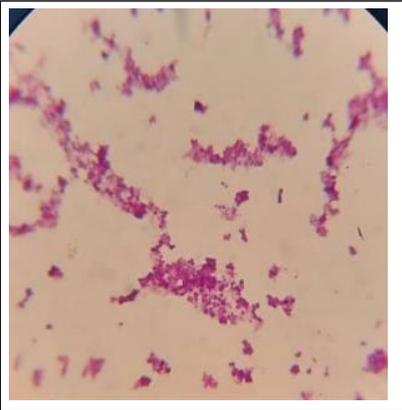
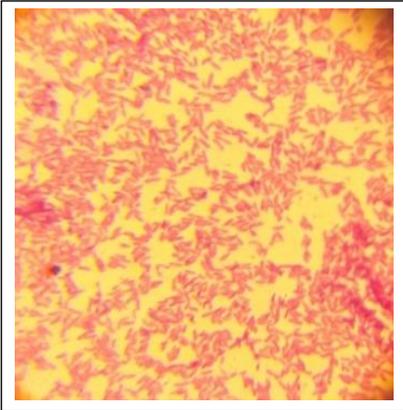


Figure 10 : Aspect microscopique de différentes souches d'actinomycètes après coloration de Gram (G×100)



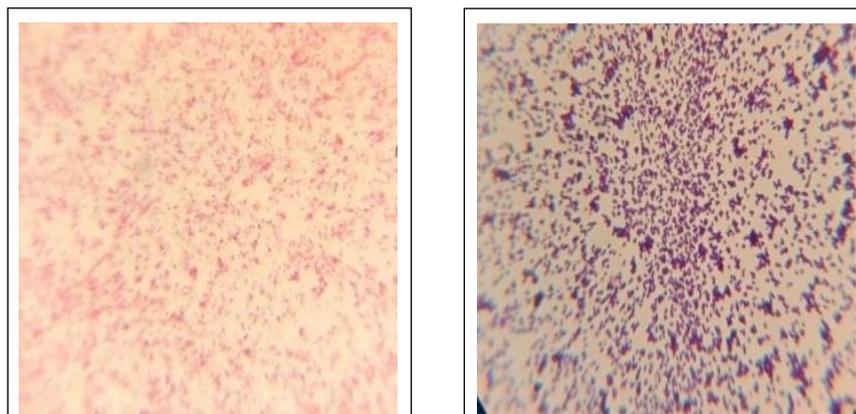


Figure 11 : Photographies de l'observation microscopique après coloration de Gram de quelques bactéries au microscope optique au grossissement G X100.

1.5. IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE

1.5.1. IDENTIFICATION PAR GALERIE API 20 :

Les résultats des différents caractères biochimiques des souches mis en évidence par la galerie Api 20^E sont réunis dans le tableau IV.

Tableau IV : Résultats de la galerie Api20E des isolats provenant de la sebkhia d'Oued djemaa

souche	ONP G	AD H	LD C	OD C	CI T	H2 S	UR E	GE L	GL U	MA N	IN O	SO R	SA C	ME L	AM Y	AR A
A1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
A2	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
A3	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
A4	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
A5	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
A6	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
A7	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
A8	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
A9	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
A10	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
A11	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
A12	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
A13	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
A14	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
A15	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
A16	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A17	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
A18	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+

A19	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
A20	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
A21	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

On observe une grande diversité entre les souches dans leur capacité à utiliser les glucides (GLU, MAN, INO, SAC, etc.) et à produire des enzymes (URE, GEL, AMY). Cela suggère que ces souches appartiennent à des espèces différentes ou présentent des adaptations métaboliques variées selon leur environnement.

- GLU (glucose) est fermentée par presque toutes les souches, ce qui montre une capacité de base à utiliser le glucose comme source d'énergie (sauf A16).

- Les souches A1, A5, A7, A13, A15, A18 sont les plus actives vis-à-vis des sucres (plus de 6 sucres fermentés).

- GEL (gélalatinase) est positive chez quelques souches, ce qui indique une activité protéolytique, compatible avec des environnements pauvres en nutriments.

- URE (uréase) est positive chez des souches. Cela pourrait refléter une capacité à survivre dans des milieux azotés ou stressés.

- AMY (amylase) est positive chez certaines souches (A10, A14, A18), ce qui suggère que peu d'entre elles produisent de l'amylase pour hydrolyser l'amidon.

- Ces activités sont peu fréquentes (la plupart des souches sont négatives), ce qui pourrait refléter une spécialisation différente du métabolisme azoté ou une expression conditionnelle de ces enzymes.

- La LDC (lysine décarboxylase) est uniquement positive chez A8 et A20.

- L'ADH (arginine dihydrolase) est positive chez 12 souches, montrant un potentiel modéré d'utilisation de l'arginine.

- La Production de H₂S est positive chez A4, A7, A8, A9, A13, A16, ce qui peut indiquer la présence d'enzymes de type thiosulfate réductase, courante chez certaines entérobactéries ou bactéries halophiles.

- ONPG (activité β-galactosidase) est positif uniquement chez A4, A14, A15, A18, A21. Ces souches sont capables de dégrader le lactose ou ses dérivés, ce qui n'est pas universel chez les bactéries environnementales.

- CIT (utilisation du citrate) : 7 souches positives, dont A4, A8, A10, A11, A12, A16, A20 ont la capacité à utiliser le citrate comme unique source de carbone (figure 12).



La souche A1



La souche A4



La souche A8



La souche A16



La souche A20

Figure 12 : Résultats de la galerie Api20E de quelques souches isolées à partir de la sebkhia d'Oued Djemaa

1.5.2. LA RECHERCHE DE LA CATALASE :

Tableau V : mise en évidence de l'activité catalase chez les isolats bactériens

La souche	Test catalase	La souche	Test catalase
A1	-	A11	-
A2	-	A12	-
A3	-	A13	-
A4	+	A14	-
A5	+	A15	-
A6	+	A16	+
A7	-	A17	-
A8	+	A18	-

A9	-	A19	-
A10	+	A20	+
A21	-		

Parmi les 21 souches isolées, 7 ont montré une activité catalasique positive, contre 14 négatives (tableau V). La catalase étant une enzyme de défense contre le stress oxydatif, sa présence indique généralement un métabolisme aérobie ou aérobie facultatif (Madigan et *al.*, 2017 ; Madigan et *al.*, 2021). La prédominance de souches catalase négatives pourrait suggérer une adaptation à des conditions anaérobies ou microaérophiles, fréquentes dans les environnements hypersalins (Oren & Garrity, 2021). Ce résultat reflète la diversité physiologique des bactéries extrêmotolérantes isolées et l'importance des tests enzymatiques dans leur caractérisation.

1.5.3. LA RECHERCHE DE L'OXYDASE

Tableau VI : Test oxydase

La souche	Test oxydase	La souche	Test oxydase
A1	-	A11	-
A2	-	A12	-
A3	+	A13	-
A4	-	A14	-
A5	-	A15	-
A6	+	A16	-
A7	-	A17	-
A8	+	A18	-
A9	-	A19	-
A10	-	A20	+
A21	+		

Parmi les 21 souches étudiées, 5 souches (A3, A6, A8, A20 et A21) se sont révélées oxydase positives, indiquant un métabolisme respiratoire aérobie actif impliquant le cytochrome c oxydase. Les autres souches ont montré un profil oxydase négatives, ce qui suggère un métabolisme fermentatif ou une respiration alternative, fréquent chez les entérobactéries ou

les bactéries vivant en milieu pauvre en oxygène. Ce test permet donc de différencier les profils métaboliques des souches, et montre une diversité physiologique parmi les bactéries extrémotolérantes isolées (tableau VI).

1.5.4. MANNITOL MOBILITE

Le jaunissement observé en surface du milieu chez les souches A1, A5, A13 et A20 indique une fermentation partielle du mannitol en conditions aérobies (figure 13). Ce changement limité à la surface suggère que ces souches sont immobiles, l'acidification ne s'étendant pas dans la profondeur du tube. Ce résultat traduit une utilisation du mannitol en présence d'oxygène, et montre une certaine adaptation métabolique à des environnements oxydés, comme les surfaces exposées à l'air. Ainsi, ce test renseigne à la fois sur la capacité fermentaire des souches vis-à-vis du mannitol et sur leur mobilité. Les souches testées ici semblent immobiles mais capables de fermenter partiellement le mannitol, ce qui peut être un indicateur de leur adaptation métabolique à des environnements oxygénés en surface, comme les croûtes salines ou les interfaces air-eau.

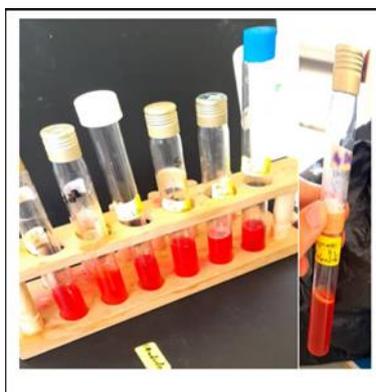


Figure 13 : Résultats de mannitol mobilité de quelques souches

1.5.5. PIGMENT MELANOÏDE

La souche A1 a produit des pigments mélanoïdes uniquement sur les milieux ISP2 et ISP4, mais pas sur les autres (figure 14). Cela montre que la composition du milieu influence fortement la production pigmentaire, en particulier la présence de sources comme le malt, la levure ou l'amidon. Ce type de production est typique de certaines bactéries comme les actinomycètes, capables de synthétiser des métabolites secondaires. Ces derniers présentent un intérêt biotechnologique potentiel, notamment pour le développement de colorants naturels, d'antioxydants ou de composés antimicrobiens issus de bactéries extrêmophiles (*EL-Naggar et al., 2020*).

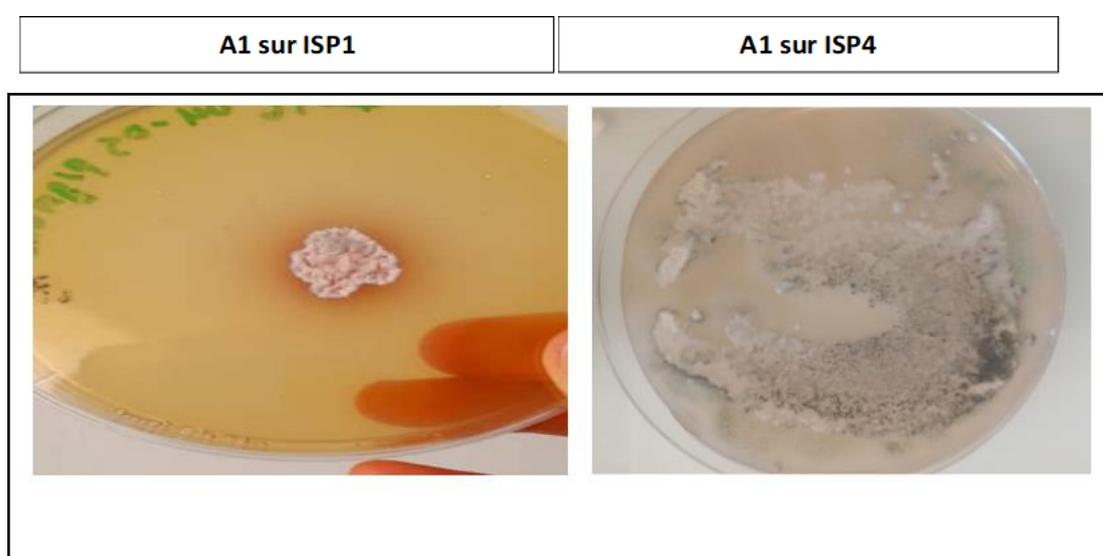


Figure 14 : Résultat de pigment mélanoïde produit par la souche A1 isolée à partir de la sebkha d'Oued Djemaa

1.6. IDENTIFICATION PHYSIOLOGIQUE

1.6.1. EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA CROISSANCE DES ISOLATS

Tableau VII : Résultats de l'effet de la température sur la croissance des bactéries isolées à partir de la sebkha d'Oued Djemaa

La souche	Température		
	4°C	37°C	50°C
A1	+++	+	-
A2	+++	-	-
A3	+++	-	-
A4	-	+	+++
A5	+++	+	-
A6	+	+	+++
A7	-	-	+++
A8	+++	++	-
A9	-	-	+++
A10	+	+	+++
A11	-	+	++
A12	++	+	-
A13	+++	++	+
A14	-	+	+++
A15	-	+	+++
A16	-	+	++
A17	-	+	++
A18	+	++	++
A19	+	+	++
A20	-	+	+++
A21	+	+	+++

(-) : Absence de croissance

(+) : Présence de croissance

(++) : Croissance moyenne

(+++): Forte croissance

Les résultats de l'étude de la croissance bactérienne à différentes températures (4 °C, 37 °C et 50 °C) révèlent une grande variabilité des profils de croissance thermique (tableau VII).

Les souches A2 et A3 ont montré une croissance uniquement à 4 °C, ce qui suggère un caractère psychrophile. La présence de souches psychrophiles (A2, A3) est intéressante dans un milieu saharien, suggérant soit une adaptation à des micro-niches froides (zones ombragées, humidité résiduelle), soit une tolérance à de fortes amplitudes thermiques. En parallèle, les souches thermophiles (A7, A9), capables de croître à 50 °C uniquement, reflètent une adaptation à des conditions extrêmement chaudes en surface, fréquentes en été dans les sebkhas (*Vargas et al., 2020*).

À l'inverse, les souches A7 et A9, qui n'ont poussé qu'à 50 °C, peuvent être considérées comme thermophiles. La majorité des autres souches, telles que A5, A8, A10, A13, A18, A21, ont présenté une croissance à 37 °C (avec ou sans croissance à d'autres températures), ce qui indique un profil mésophile ou mésotolérant, fréquent chez les bactéries environnementales. Ce profil est typique des bactéries environnementales, mais la tolérance simultanée au froid ou à la chaleur observée chez certaines d'entre elles (ex. A6, A10, A13, A18) indique une plasticité thermique, précieuse pour leur survie en environnement hostile. Ces résultats confirment l'intérêt écologique et biotechnologique de ces souches extrêmotolérantes, capables de fonctionner dans des conditions de température très variables (*Amoozegar et al., 2019 ; Oren, 2021*).

1.6.2. EFFET DE PH

Tableau VIII : Effet du pH sur la croissance des isolats

La souche	Ph		
	4	7	9
A1	+++	+	-
A2	+++	+	-
A3	+	++	+++
A4	+++	+	-
A5	+	+	+
A6	-	-	+++
A7	+++	-	-
A8	+++	+	+
A9	+++	-	-
A10	+	+	+
A11	+	+	+
A12	+++	-	-
A13	+	+	+
A14	+	+++	+
A15	-	+++	-
A16	+++	++	-
A17	-	+	+++
A18	-	++	-
A19	+	+	+++
A20	+++	+	+
A21	+++	++	+

(-) : Absence de croissance

(+) : Présence de croissance

(++) : Croissance moyenne

(+++): Croissance forte

L'étude de la croissance à différents pH (4, 7 et 9) a mis en évidence une diversité physiologique marquée parmi les souches isolées de la sebkha d'Oued Djemaa (tableau VIII). Trois profils principaux ont été identifiés :

Les souches A7, A9 et A12 ont montré une croissance uniquement à pH 4, ce qui les qualifie d'acidophiles. Cette capacité à tolérer des milieux acides peut refléter une adaptation à des micro-environnements localement acidifiés, par exemple par des dépôts organiques ou certaines réactions chimiques du sol (Narsing Rao *et al.*, 2022).

La souche A6 s'est développée exclusivement à pH 9, ce qui en fait une basophile stricte. De telles bactéries alcaliphiles sont souvent rencontrées dans des environnements salins évaporitiques où le pH peut s'élever du fait de la concentration en ions carbonates ou hydroxydes (Oren, 2021). Les souches A15 et A18, qui poussent uniquement ou préférentiellement à pH 7, sont classées comme neutrophiles, indiquant une adaptation à des conditions plus modérées et stables.

La majorité des autres souches, comme A3, A8, A14, A21, ont montré une croissance à plusieurs valeurs de pH, traduisant une tolérance aux variations de pH. Cette plasticité physiologique est souvent observée chez les bactéries extrêmotolérantes, leur permettant de survivre dans des milieux à forte variabilité physico-chimique, typiques zones humides salines (Ventosa *et al.*, 2015 ; Amoozegar *et al.*, 2019).

1.6.3. LA SALINITE

Tableau IX : Effet de la salinité sur la croissance des isolats provenant de la sebkha d'Oued djemaa

La souche	Nacl		
	5%	10%	15%
A1	-	++	+++
A2	-	+	++
A3	+++	+	-
A4	+++	++	-
A5	+++	++	+
A6	+++	-	-
A7	+++	-	-
A8	-	-	+++

A9	+	+	++
A10	+++	-	-
A11	+++	-	-
A12	-	-	+++
A13	++	+	+
A14	++	-	-
A15	++	+	-
A16	++	++	-
A17	+++	+++	-
A18	+++	++	+
A19	++	+++	
A20	-	-	+++
A21	+++	-	-

(-) : Absence de croissance

(+) : Présence de croissance

(++) : Croissance moyenne

(+++): Croissance forte

L'évaluation de la croissance bactérienne en présence des concentrations croissantes de NaCl (5 %, 10 %, 15 %) a permis de classer les souches selon leur tolérance à la salinité. Certaines souches comme A5 et A9 ont montré une bonne croissance à toutes les concentrations testées, traduisant un caractère halophile modéré. Ces souches sont capables de prospérer dans des conditions salines typiques des sebkhas.

Les souches A2, A8, A12 et A20, quant à elles, n'ont montré de croissance significative qu'à 15 % de NaCl, ce qui indique une forte tolérance (tableau IX). Elles peuvent être considérées comme halophiles extrêmes, car leur croissance est strictement dépendante de conditions fortement salines. Ce type d'adaptation est courant chez des bactéries isolées de milieux hypersalins concentrés ou évaporitiques (*Gunde-Cimerman et al., 2018*).

En revanche, des souches comme A6, A7, A10, A11, A21 ont montré une croissance uniquement à faible salinité (5 %), ce qui témoigne d'une tolérance limitée au sel. Cela peut s'expliquer par leur appartenance à des genres moins spécialisés dans les environnements hypersalins, ou par leur localisation dans des micro-niches moins concentrées.

La diversité des profils halotolérants observés montre la variabilité osmotique naturelle des sebkhas, où l'humidité, l'évaporation et la concentration en sels changent au cours des saisons. Une telle variabilité permet la coexistence de souches halotolérantes, halophiles et halophiles extrêmes dans un même site.

1.7. LA MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Les bactéries extrémotolérantes productrices d'enzymes telles que la protéase, la lipase, l'amylase, l'uréease, la pectinase et la chitinase constituent des outils précieux pour le développement et la biotechnologie industrielle et commerciale notamment dans les domaines de l'industrie alimentaire, du textile, du traitement des déchets ainsi que dans les applications médicales.

Dans notre étude, nous avons travaillé sur 21 souches afin de tester la présence ou l'absence d'activités hydrolytiques sur des substrats tels que l'amidon, la caséine, la gélatine, le tween 80, l'urée, la pectine et la chitine. Les résultats montrent que la production des activités enzymatiques a été observée chez la majorité des isolats étudiés.

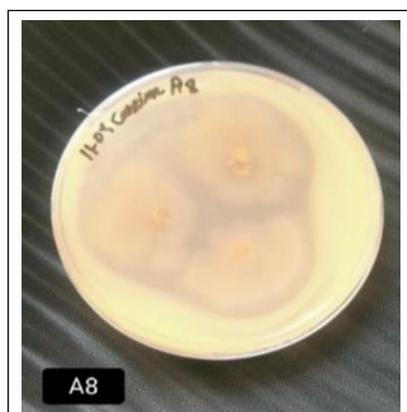
1.7.1. RECHERCHE DES PROTEASES

1.7.1.1. DEGRADATION DE LA CASEINE

Parmi les 21 souches étudiées des bactéries extrémotolérantes, 15 souches possèdent l'enzyme (caséinase).

La caséine dans la gélose au lait écrémé a été hydrolysée par une caséinase produite par ces bactéries extrémotolérantes, cette activité se traduit par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie (figure 15).

Cette activité enzymatique, typique des bactéries extrémotolérantes, présente un fort potentiel biotechnologique, notamment en conditions industrielles extrêmes (**Dumorné et al., 2017**). Sa présence dans un environnement comme la sebkha indique une adaptation aux conditions extrêmes et une capacité à exploiter les ressources limitées (**Ali et al., 2021**). L'absence d'activité chez certaines souches suggère des différences métaboliques ou une régulation variable de l'enzyme.



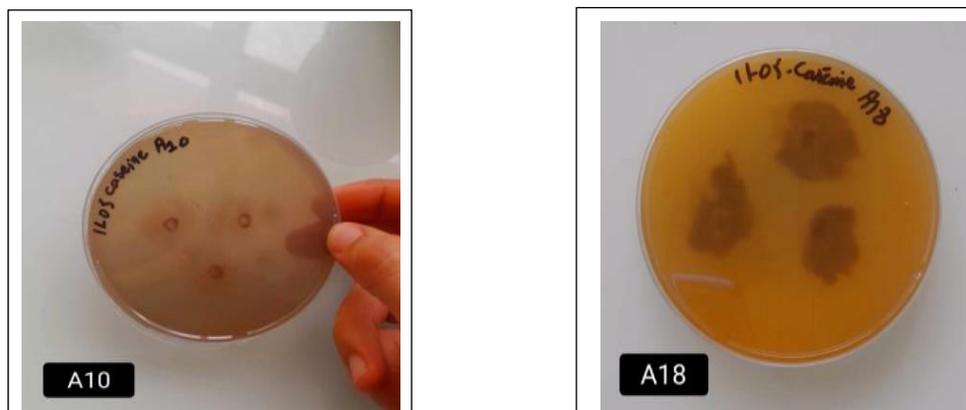


Figure 15 : Résultat du test d'activité caséinolytique

1.7.1.2. DEGRADATION DE LA GELATINE

Après incubation des tubes contenant de la gélatine en présence de la souche bactérienne testée, les tubes sont placés au réfrigérateur pendant 30 minutes pour confirmer la liquéfaction.

Nos résultats de 21 souches étudiées montrent que 07 souches ont pu produire l'enzyme de gélatinase.

Cette activité se traduit par liquéfaction de milieu cela indique que la gélatine a été hydrolysée par l'enzyme gélatinase produite par la bactérie (résultat positif) (figure 16).

La production de gélatinase par certaines souches bactériennes isolées de sebkha représente un avantage d'adaptation dans des environnements pauvres en azote, en leur permettant de dégrader des protéines complexes comme la gélatine pour accéder à des sources d'azote organique (Ali *et al.*, 2021). Ces enzymes, stables en conditions extrêmes, sont également prometteuses pour des applications biotechnologiques variées, notamment en cosmétique, pharmacie et traitement des déchets protéiques (Dumorné *et al.*, 2017 ; Antranikian, 2007). L'absence d'activité enzymatique chez d'autres souches pourrait résulter d'une régulation différentielle ou d'une spécialisation métabolique vers d'autres substrats (Zhou *et al.*, 2019).

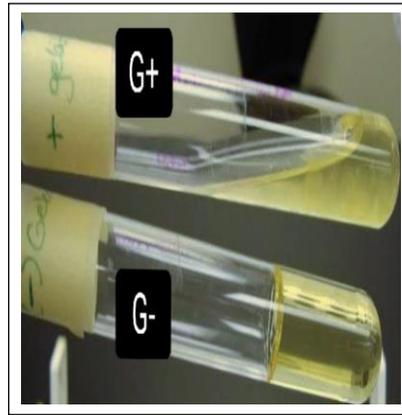


Figure 16 : Résultat de test gélatinase

1.7.2. DEGRADATION DES LIPIDES

1.7.2.1. DEGRADATION DU TWEEN 80

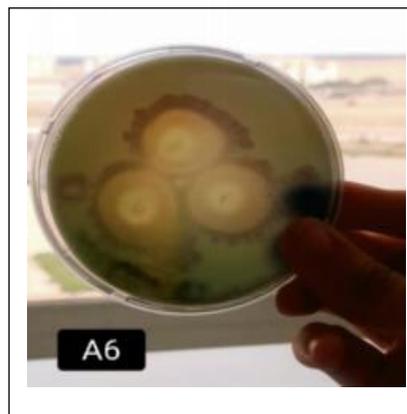


Figure 17 : Résultat du test de l'hydrolyse du tween 80

Parmi les 21 souches testées, 10 ont montré une activité lipasique en hydrolysant le Tween 80, comme en témoignent les zones opaques observées autour des colonies, traduisant la formation d'acides gras insolubles (figure 17).

L'hydrolyse du Tween 80 par 10 souches témoigne de la production de lipases extracellulaires, enzymes capables de dégrader les esters lipidiques en acides gras et alcool. Ces résultats suggèrent une adaptation métabolique permettant l'exploitation de sources lipidiques disponibles dans des environnements hostiles, comme les sebkhas, souvent pauvres en nutriments facilement assimilables (Ali *et al.*, 2021).

Les lipases produites par des bactéries extrêmotolérantes présentent un fort intérêt industriel en raison de leur stabilité dans des conditions extrêmes (températures élevées, pH variés, forte salinité), ce qui les rend utiles dans les domaines de la biodégradation, des détergents, de la synthèse d'esters ou de la biocatalyse (Dumorné *et al.*, 2017 ; Antranikian, 2007).

1.7.3. DEGRADATION DES SUCRES

1.7.3.1. DEGRADATION DE L'AMIDON

Parmi les 21 souches extrêmotolérantes testées, seules 3 ont montré une activité amylolytique, indiquant une capacité limitée à hydrolyser l'amidon (figure 18). Cette activité, révélée par un halo clair après ajout de lugol, suggère la production d'amylases extracellulaires. La faible fréquence de cette activité peut s'expliquer par une adaptation des souches à d'autres substrats plus disponibles dans les environnements salins, comme les protéines ou les lipides (Ali *et al.*, 2021).

Malgré cela, les amylases produites par des bactéries extrêmophiles ou extrêmotolérantes présentent un fort intérêt biotechnologique en raison de leur stabilité en conditions extrêmes, ce qui est recherché dans les secteurs agroalimentaire ou bioénergétique (Dumorné *et al.*, 2017 ; Ghosh *et al.*, 2020).

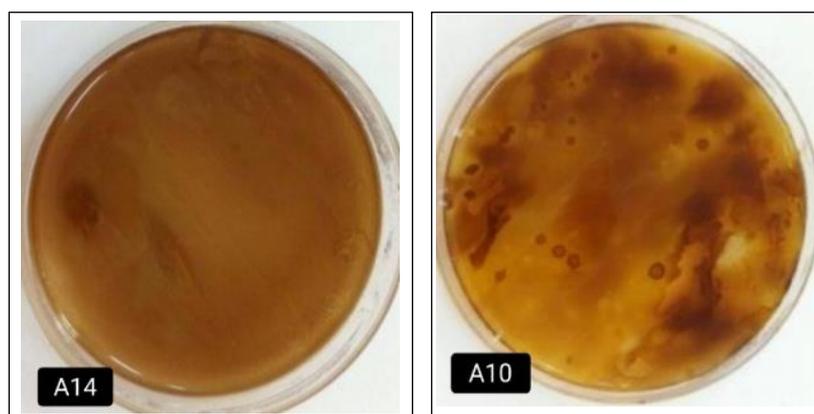




Figure 18 : Résultat de test d'hydrolyse de l'amidon

TABLEAU X : Résultats des activités enzymatiques des 21 souches sélectionnées

Souche	La caséine	La gélatine	Tween 80	Amidon
A1	+	+	+	-
A2	+	+	+	-
A3	-	-	-	-
A4	-	-	-	-
A5	+	+	+	-
A6	+	-	+	-
A7	+	+	+	-
A8	+	-	-	-
A9	+	-	-	-
A10	+	-	+	+
A11	-	+	-	-
A12	-	-	-	-
A13	-	-	-	-
A14	+	-	-	+
A15	+	-	+	-
A16	+	-	+	-

A17	-	+	-	-
A18	+	+	+	+
A19	+	-	+	-
A20	+	-	-	-
A21	+	-	-	-

L'analyse comparative des 21 souches extrémotolérantes montre une grande variabilité enzymatique. L'activité caséinolytique est la plus répandue, observée chez 15 souches, tandis que l'activité amylolytique reste rare avec seulement 3 souches positives (A10, A14, A18). Dix souches possèdent une activité lipasique détectée par l'hydrolyse du Tween 80, et 8 présentent une activité gélatinolytique (tableau X).

Parmi elles, **la souche A18** se démarque nettement en exprimant les quatre activités enzymatiques testées, ce qui témoigne d'un potentiel hydrolytique complet. De plus, cette souche a montré une tolérance aux conditions extrêmes (pH basique, forte salinité, température élevée), ce qui renforce son intérêt pour des applications biotechnologiques dans des procédés industriels très exigeants.

Les souches A1, A2, A5 et A7, positives pour la caséinase, la gélatinase et la lipase, présentent également un bon potentiel, bien qu'elles soient dépourvues d'activité amylolytique. À l'inverse, certaines souches comme A3, A4, A12 et A13 n'ont révélé aucune activité dans les conditions de test, ce qui pourrait indiquer une régulation conditionnelle de leurs enzymes ou une spécialisation vers d'autres fonctions métaboliques orientée vers d'autres fonctions que l'hydrolyse de macromolécules (**Zhou et al., 2019 ; Dumorné et al., 2017**). Ce type de résultat est fréquent chez les bactéries vivant en milieux extrêmes, où la flexibilité métabolique est souvent dictée par la rareté et la nature des ressources disponibles (**Ali et al., 2021**).

1.7.4. DEGRADATION D'AUTRES SUBSTRATS

1.7.4.1. DEGRADATION DE L'UREE

Presque toutes les souches des bactéries extrémotolérantes étudiées ne possèdent pas de l'enzyme uréase, à l'exception de 05 souches A19, A6, A18, A10 et A2 (figure 19).

L'uréase permet d'hydrolyser l'urée contenue dans le milieu de Fergusson, et la libération de l'ammoniac (NH₃) fait virer l'indicateur au rose violacée (alcalinisation du milieu).

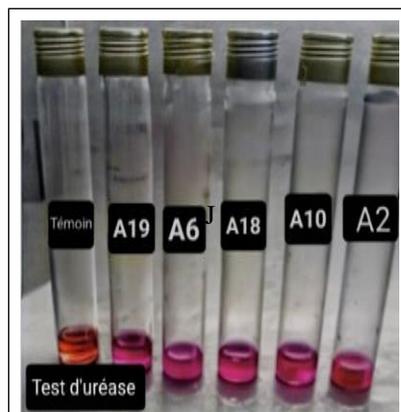


Figure 19 : Résultat de test uréase

1.7.4.2. DEGRADATION DE LA PECTINE

Le test de recherche de la pectinase s'est révélé négatif pour l'ensemble des souches bactériennes extrémotolérantes étudiées (A1 à A21), indiquant l'absence apparente de cette activité enzymatique dans les conditions expérimentales utilisées (figure 20). Ce résultat peut être interprété de différentes façons : soit ces souches ne possèdent pas l'enzyme pectinase, soit l'expression de cette enzyme est régulée par des conditions spécifiques non reproduites dans le laboratoire (par exemple un pH acide ou une température optimale spécifique) (Jayani *et al.*, 2005 ; Sharma *et al.*, 2013).

De plus, le fait que ces souches aient été isolées d'un environnement salin, où la matière végétale est rare, suggère qu'elles n'ont pas évolué de mécanismes de dégradation de la pectine, un polysaccharide essentiellement présent dans les parois cellulaires des plantes. Il est donc possible que la production de pectinase n'apporte aucun avantage sélectif dans un tel milieu, ce qui expliquerait son absence (Samtani *et al.*, 2021).

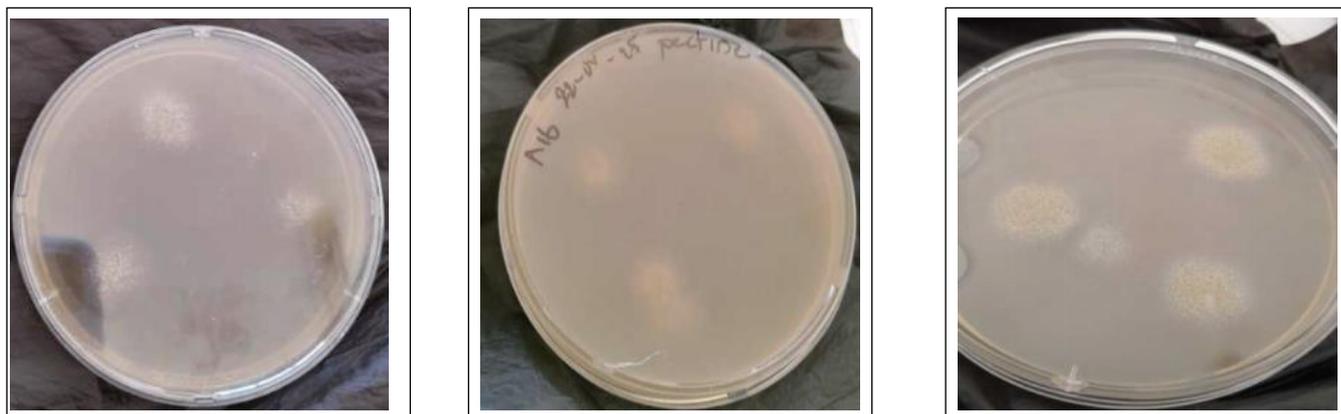


Figure 20 : Résultat du test de recherche de la pectinase

1.7.4.3. DEGRADATION DE LA CHITINE

Le résultat de la dégradation de la chitine a révélé que 4 souches sur les 21 bactéries extrémotolérantes étudiées présentent une activité chitinolytique. Cette activité a été mise en évidence par l'apparition d'un halo clair autour des colonies sur le milieu contenant de la chitine, indiquant l'hydrolyse de ce polymère (figure 21).

Il est important de souligner que la chitine utilisée dans ce test a été extraite à partir de déchets de carapaces de crevettes, ce qui confère à ce travail une double valeur : scientifique et environnementale. En effet, cette approche permet à la fois de valoriser un sous-produit marin souvent mal exploité et d'explorer le potentiel enzymatique de bactéries capables de le dégrader. Cela s'inscrit dans une démarche d'économie circulaire et de biovalorisation durable des déchets marins. Ce résultat suggère que certaines souches extrémotolérantes pourraient être exploitées pour produire des chitinases halotolérantes, utiles dans diverses applications biotechnologiques comme le traitement de déchets chitineux, la production de chito-oligosaccharides à haute valeur ajoutée ou encore le biocontrôle. Des études récentes confirment cet intérêt, notamment avec des bactéries comme *Bacillus paralicheniformis* ou *Vibrio harveyi*, capables de produire des chitinases efficaces en conditions salines (Zhang *et al.*, 2024 ; Li *et al.*, 2023).

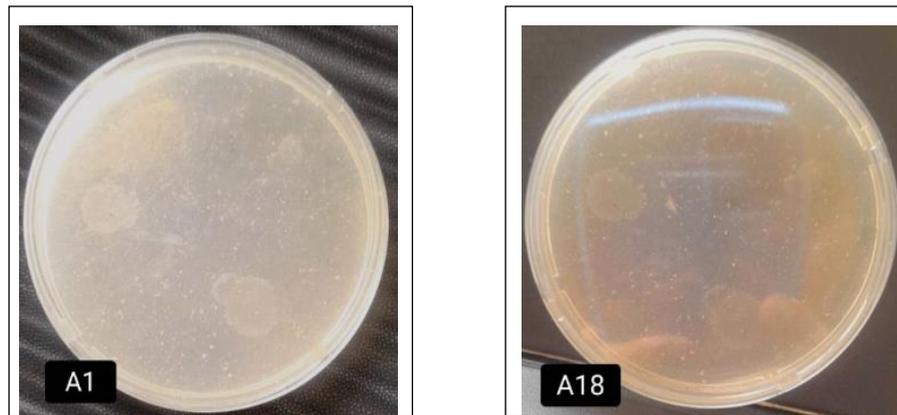


Figure 21 : Résultat de l'activité chitinolytique chez les isolats provenant de la sebkha d'Oued Djemaa

Conclusion

L'étude de la diversité bactérienne extrémotolérante dans la sebkha d'Oued Djemaa a permis de mettre en évidence la capacité de certaines souches microbiennes à survivre et se développer dans un environnement extrême, notamment une salinité élevée.

Les 21 souches isolées ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique préliminaire à travers des tests morphologiques, biochimiques et physiologiques, incluant notamment la coloration de Gram, permettant de distinguer les bactéries à Gram positif et Gram négatif selon leur forme et leur mode d'organisation cellulaire.

Les résultats obtenus révèlent non seulement la grande richesse microbienne de cet écosystème, mais offrent également des perspectives intéressantes en biotechnologie. En effet, certaines souches comme la A18 pourraient produire des enzymes actives dans des conditions extrêmes, ouvrant ainsi la voie à des applications potentielles dans les domaines de la santé, de l'industrie agroalimentaire ou environnementale, ou encore dans la recherche de molécules bioactives d'intérêt.

Au-delà de l'aspect applicatif, cette étude contribue à une meilleure compréhension des mécanismes d'adaptation et d'évolution des micro-organismes dans les milieux hostiles. Elle constitue également une base pour des recherches futures pour approfondir l'étude des bactéries extrême tolérantes isolées des milieux extrêmes et qui portera sur :

1. L'Identification moléculaire des souches isolées : Le recours au séquençage du gène 16S rRNA permettrait une identification précise des espèces bactériennes et une meilleure compréhension de leur phylogénie.
2. La caractérisation approfondie des enzymes produites : Il serait pertinent d'optimiser les conditions de production enzymatique (pH, température, substrat) et de caractériser leurs propriétés catalytiques pour une potentielle valorisation biotechnologique.
3. L'études métagénomiques et métabolomiques : L'analyse directe de l'ADN environnemental ou des métabolites présents dans la sebkha pourrait révéler une diversité microbienne encore non cultivable, ainsi que des voies métaboliques originales.
4. L'étude des interactions microbiennes dans l'écosystème salin : Comprendre les relations (coopération, compétition) entre les souches pourrait apporter un éclairage sur les mécanismes de coexistence et de résilience dans les milieux extrêmes.
5. L'évaluation du potentiel antimicrobien ou biotechnologique des souches : Tester les extraits bactériens pour détecter d'éventuelles activités antimicrobiennes, antioxydantes ou industrielles (détergence, bioénergie, etc.) pourrait déboucher sur des applications concrètes.

6. La surveillance écologique et conservation : Mener des études à plus long terme sur l'impact des changements climatiques ou des activités humaines sur la biodiversité microbienne des sebkhas contribuerait à la préservation de ces écosystèmes fragiles.

Ces travaux permettront de mieux appréhender le fonctionnement global de ces milieux extrêmes, tout en explorant leur potentiel biotechnologique encore largement sous-exploité.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Achhal, A., Ziri, R., & Khattabi, A. (2014). Analyse phytosociologique des formations de matorral du massif des Béni-Snassène (Maroc Oriental). *Acta Botanica Malacitana*, 29, 67–87.

Ahmed Mehdi, B. (2014). *Screening de souches extrêmophiles halophiles du genre Bacillus de la Sebkhah d'Oran (caractérisation phénotypique)* (Mémoire de Master en microbiologie). Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, 100 p.

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).

Ara, I., Bukhari, N. A., Wijayanti, D. R., & Bakir, M. A. (2012). Proteolytic activity of alkaliphilic, salt-tolerant actinomycetes from various regions in Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 11(16), 3849–3857.

B

Badji, B., Riba, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Sabaou, N. (2005). Activité antifongique d'une souche d'*Actinomyces* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie Médicale*, 15, 211–219.

Belala Seif, E., Cherouat, B., & Bouseba, A. (2021). *Les extrêmophiles dans leurs environnements et leurs applications biotechnologiques* (Mémoire de Master en écologie microbienne). Université des Frères Mentouri, Constantine, 46 p.

Bennabi, F., Ben Meddah, M., Toumi, F., Hamel, L., Megharbi, A., Koudache, F., & Ghomari, S. (2015). Étude éco-biologique d'*Artémia salina* des zones humides de l'Ouest Algérien. *Afrique Science*, 11(2), 97–106.

Besse, A. (2016). *Interactions microbiennes et adaptations en milieu extrême : peptides antimicrobiens d'archées halophiles* (Thèse de doctorat en microbiologie). École doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227, Paris, 313 p.

Bonnet, B., Aulong, S., Goyet, S., Lutz, M., & Mathevet, R. (2005). *Gestion intégrée des zones humides méditerranéennes : Conservation des zones humides*. Tour du Valat, Arles, 160 p.

Boussaber, E., Kadmiri, I. M., Hilali, L., & Hilali, A. (2012). Isolement des souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques. *ScienceLib Editions Mersenne*, 4, 2111–4706.

Querellou, J., & Guezennec, J. (2010). *Biotechnologie des extrêmophiles. Techniques de l'ingénieur*, BIO 580, 26 p.

C

Christel, S. (2018). *Function and adaptation of acidophiles in natural and applied communities*. Linnaeus University Press, No 328, 99 p.

D

Detay, M., & Thomas, P. (2018). *Les extrémophiles dans leurs environnements géologiques – Un nouveau regard sur biodiversité et sur la vie terrestre et extraterrestre*. Planet-Terre, 28 p.

DGF – Direction Générale des Forêts. (2011). *Atlas IV des zones humides algériennes d'importance internationale*. Éditions Diwan, 105 p.

Dumorné, K., Camacho Cordova, D., Astorga-Ela, M., & Renganathan, P. (2017).

Extremozymes: A potential source for industrial applications. *Journal of Microbial Biotechnology*, 27(4), 649–659.

E

El-Nakeeb, M. A., & Lechevalier, H. A. (1963). Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Applied Microbiology*, 11(2), 75–77.

F

Fetnaci, I., Beddiar, A., & Hamel, T. (année non précisée). Le lac Fetzara : biodiversité et menaces potentielles. *Flora Mediterranea*, 31, 14–25.

Fustec, E., & Lefevre, C. (2000). *Fonctions et valeurs des zones humides*. Paris : Dunod, 426 p.

G

Gomes, J., & Steiner, W. (2004). The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*, 42(4), 223–235.

Gomri, M. A. (2019). *Contribution à l'étude de la diversité des bactéries thermophiles de quelques environnements chauds algériens et essai de production et caractérisation de leurs protéases extracellulaires* (Thèse de doctorat en sciences alimentaires). Université Frère Mentouri Constantine 1, Institut de la nutrition, de l'alimentation et de technologies agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A), 336 p.

Grant, W. D., Mwatha, W. E., & Jones, B. E. (1990). Alkaliphiles: Ecology, diversity and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 6(2–3), 255–269.

Gregoire, P., Fardeau, M. L., Guasco, S., Bouanane, A., Michotey, V., Bonin, P., Dubourg, K., Cambar, J., & Ollivier, B. (2009). Les micro-organismes de l'extrême. *Presse Thermale et Climatique*, 146, 49–61.

Guiraud, J. P. (1998). Techniques d'analyses microbiologiques. In *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris, pp. 168–333.

H

Hayakawa, M., & Nonomura, H. (1987). Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, 65(5), 501–509.

Horikoshi, K. (1999). Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 735–750.

I

Djinni, I. (2016/2017). *Cours de micro-organismes des milieux extrêmes*. Université Abderahmane Mira – Béjaïa, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Microbiologie, 100 p.

Ilahi, N., Bahadur, A., Wang, W., Degen, A., Kang, S., Sajjad, W., & Shang, Z. (2022). Diversity, distribution, and function of bacteria in the supraglacial region hit by glacial lake outburst flood in northern Pakistan. *Environmental Sciences Europe*, 34(1), 18 p.

J

Johnson, D. B., & Quatrini, R. (2020). Acidophile microbiology in space and time. *Current Issues in Molecular Biology*, 39.

Johnson, D. B., & Schippers, A. (2017). Editorial: Recent advances in acidophile microbiology: Fundamentals and applications. *Frontiers in Microbiology*, 8, 428.

K

Kaur, A., Capalash, N., & Sharma, P. (2019). Communication mechanisms in extremophiles: Exploring their existence and industrial applications. *Microbiological Research*, 221, 15–2

Kitouni, M. (2007). *Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes : identification moléculaire des souches actives et*

caractérisation préliminaire des substances élaborées (Thèse de doctorat en microbiologie). Université Mentouri – Constantine, 24 p.

Kudapa, H., Katta, K., & Varshney, R. K. (2014). Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiological Research*, 169(1), 40–48.

Kumar, S., Grewal, J., Sadaf, A., Hemamalini, R., & Khare, S. K. (2016). Halophiles as a source of polyextremophilic α -amylase for industrial applications. *AIMS Microbiology*, 2(1), 1–26.

Kumar, V., & Tiwari, S. (2019). Halocin diversity among halophilic archaea and their applications. In *Springer eBooks*, pp. 497–532.

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 Technology*.

L

Lebre, P. H., & Cowan, D. A. (2019). Genomics of alkaliphiles. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 172, 135–155.

Limam, I., Ghrabi-Gammar, Z., de Bélair, G., & Garcia, N. (2010). *Bellis prostrata* Pomel. *Acta Botanica Malacitana*, 35, 207–[page end not specified].

M

Maouchi, S., & Medjedoub, D. (2020). *Étude bibliographique portant sur les environnements chauds : les microorganismes thermophiles et leurs applications* (Mémoire de Master en biotechnologie microbienne). Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 52 p.

Mei, N. (2016). *Écologie des micro-organismes producteurs d'hydrogène des sources hydrothermales alcalines associées à la serpentisation en Baie de Prony, Nouvelle-Calédonie* (Thèse de doctorat en océanographie). Aix-Marseille Université, 215 p.

Menasria, T. (2020). *Biodiversité microbienne dans les milieux extrêmes salés du Nord-Est algérien* (Thèse de doctorat en microbiologie appliquée). Université Mustapha Ben Boulaïd – Batna 2, 196 p.

O

Orellana, R., Macaya, C., Bravo, G., Dorochesi, F., Cumsille, A., Valence, R., Rojas, C., & Seeger, M. (2018). Living at the frontiers of life: Extremophiles in Chile and their potential for bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 25.

Oren, A. (2002). *Halophilic Microorganisms and Their Environments*. Kluwer Publishers, Dordrecht, pp. 471–491.

P

Pikuta, E. V., Hoover, R. B., & Tang, J. (2007). Micro extremophiles at the limits of life. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(3), 183–209.

Pomel, A. (1875). Nouveaux matériaux pour la flore atlantique. Fasc. 2. *Bulletin de la Société des Sciences Physiques, Naturelles et Climatologiques de l'Algérie*.

R

Rabouhi, L., & Benbrahim, R. (2022). *Essai de caractérisation d'exoenzymes produites par une bactérie extrêmophile du genre Halorubrum* (Mémoire de Master en microbiologie appliquée). Université Kasdi Merbah, Ouargla, 76 p.

Rhazi, M., Grillas, P., Charpentier, A., & Médail, F. (2001). Experimental management of Mediterranean temporary pools for conservation of the rare quillwort *Isoetes setacea*. *Biological Conservation*, 118, 675–684.

Ruan, J., Chen, H. H., & Huang, Y. (2005). Diversity and biotechnological potential of actinobacteria isolated from marine sediments in China. *Microbiological Research*, 160(2), 111–120.

S

Sahli, K. (2021). *Étude des Archaea halophiles extrêmes isolées d'environnements hypersalins algériens et caractérisation de leurs caroténoïdes* (Thèse de doctorat en biotechnologie). Université des Frères Mentouri, Constantine, 239 p.

Salem, F. (2019). *Profil des enzymes hydrolytiques des champignons filamenteux isolés d'un milieu extrême (Chott Tiguidine)* (Mémoire de Master en microbiologie appliquée). Université Mohamed Khider de Biskra, 62 p.

Samraoui, B., De Belair, G., & Benyacoub, S. (1992). A much threatened lake: Lac des Oiseaux in Northeastern Algeria. *Environmental Conservation*, 19(3), 264–267 + 276.

Schleper, C., Pühler, G., Kuhlmoorgen, B., & Zillig, W. (1995). Life at extremely low pH. *Nature*, 375, 741–742.

Schleper, C., Pühler, G., Klenk, H. P., & Zillig, W. (1996). *Picrophilus oshimae* and *Picrophilus torridus* fam. nov., gen. nov., sp. nov., two species of hyperacidophilic,

thermophilic, heterotrophic, aerobic Archaea. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(3), 814–816.

Scoof-Vanpelt, M. M. (1973). *Littorelletea. A study of the vegetation of source amphiphytic communities of Western Europe*. Druk: Stichting Studentenpers Nijmegen, 216 p.

Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313–340.

Shukla, P. J., Bhatt, V. D., Suriya, J., & Mootapally, C. (2020). Marine extremophiles: adaptations and biotechnological applications. *Encyclopedia of Marine Biotechnology*, 5(1), 1753–1771.

Skinner, J., & Zalewski, S. (1995). *Fonctions et valeurs des zones humides méditerranéennes*. Conservation des zones humides méditerranéennes. MedWet, Tour du Valat, 78 p.

T

Tiwari, K., & Gupta, R. K. (2012). Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(3), 256–294.

U

Ulukanlı, Z., & Digrak, M. (2002). Alkaliphilic micro-organisms and habitats. *Turkish Journal of Biology*, 26, 181–191.

V

Ventosa, A., Fernández, A. B., León, M. J., Sánchez-Porro, C., & Rodríguez-Valera, F. (2014). The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments. *Extremophiles*, 18, 811–824.

W

Whitman, W. B., Krieg, N. R., Hedlund, B. P., Paster, B. J., & Daniel, R. (2010). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Heidelberg, London, pp. 25–49.

X

Xie, K., Deng, Y., Zhang, S., Zhang, W., Liu, J., Xie, Y., Zhang, X., & Huang, H. (2017). Prokaryotic community distribution along an ecological gradient of salinity in surface and subsurface saline soils. *Scientific Reports*, 7(1), 11.

Z

Zedam, A. (2015). *Étude de la flore endémique de la zone humide de Chott El-Hodna. Inventaire - Préservation* (Thèse de doctorat en sciences). Université Sétif 1, 197 p.

Zhou, Z., Wang, C., & Luo, Y. (2023). Effects of long-term organic amendments on soil microbial diversity and carbon sequestration. *Science of The Total Environment*, 858, 160062. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160062>

Annexes

Milieux de culture

Bouillon nutritif

Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2g
Tryptone	5 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5 g
Eau distillée	1000 ml
pH =07	

• Gélose nutritive

Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2g
Tryptone	5 g
Agar Agar	15 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5 g
Eau distillée	1000 ml
pH=07	

2. Milieux d'isolement

• Gélose à l'extrait de malt (GLM)

Glucose	10g
Extrait de levure	3g
Extrait de malt	3g
peptone	5 g
Eau distillés q.s.q	1000 ml pH =7,2

• **Bennett**

D-Glucose anhydre	10g
Casaminoacides	2g
Extrait de levure	1g
Extrait de viande	1g
Agar	15g
Eau distillés q.s.q	1000 ml

pH =7,2

• **Glucose Asparagine (GA)**

Glucose	10g
Asparagine	0,5g
K ₂ HPO ₄	0,5g
Agar	15g
Eau distillés q.s.q	1000 ml

pH =6

2. Milieux d'identification (Sherling et Gottlieb , 1966)

ISP1 (Tryptone-extrait de levure-agar ou Tryptone-yeast extract-agar)

Tryptone	5 g	
Extrait de levure	3 g	
Agar	20 g	
Eau distillés q.s.q	1000 ml	pH =7,2

ISP2 (Extrait de levure-extrait de malt-agar ou Yeast extract- malt extract-agar)

Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
Glucose	4 g
Agar	20 g
Eau distillés q.s.q	1000 ml

pH = 7,2

ISP3 (Farine d'avoine-agar ou oatmeal-agar)

Farine d'avoine	20 g
Solution saline standard	1 ml
Agar	18 g
Eau distillés q.s.q	1000 ml pH =7,2

Solution saline standard

FeSo ₄ , 7H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g
Eau distillés q.s.q	100 ml

ISP4 (Amidon-sels minéraux-agar ou Inorganic salts-starch-agar)

Solution I

Amidon	10 g
Eau distillés q.s.q	500 ml

Solution II

K ₂ HPO ₄	1 g	
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1 g	
NaCl	1 g	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g	CaCO ₃ 2 g
500 ml	pH = 7,2	Eau distillés q.s.q

Après dissolution, les deux solutions sont mélangées, 20 g d'agar sont ensuite ajoutés

ISP5 (Glycérol-asparagine-agar)

L-asparagine	1 g
Glycérol	10 g
Phosphate bipotassique anhydre	1 g
Solution saline standard	1 ml
Eau distillés q.s.q	1000ml
Agar	20 g

ISP6 (Peptone-extrait de levure-sel ferrique-agar ou peptone-yeast extract-iron-agar)

Peptone bactériologique	20 g
Citrate ferrique d'ammonium	0,5 g
Phosphate bipotassique	1 g
Thiosulfate de sodium	0,08 g
Extrait de levure	1 g
Eau distillés q.s.q	1000 ml
Agar	15 g

ISP7 (Tyrosine-agar)

Glycerol	15 g
L-tyrosine	0,5 g
L-asparagine	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,01 g
Solution saline standard	1 ml
Eau distillés q.s.q	1000 ml
Agar	20 g

4. Milieu pour testes physico-chimiques**4.1. Croissance à différentes températures****• Milieu ISP2 (International Streptomyces Project 2)**

Glucose	04g
Extrait de levure	04g
Extrait de malt	10g
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH= 7.2

• **Milieu ISP2 (International Streptomyces Project 2) à pH= 04**

Glucose	04g
Extrait de levure	04g
Extrait de malt	10g
Eau distillée	1000 ml pH= 04

• **Milieu ISP2 (International Streptomyces Project 2) à pH= 04, pH=07, pH=09**

Glucose	04g
Extrait de levure	04g
Extrait de malt	10g
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH= 04 , pH=07, pH=09

• **Milieu ISP2 (International Streptomyces Project 2) à 5% NaCl**

Glucose	04g
Extrait de levure	04g
Extrait de malt	10g
NaCl	70 g
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g pH= 7.2

• **Milieu ISP2 (International Streptomyces Project 2) à 10% NaCl**

Glucose	04g
Extrait de levure	04g
Extrait de malt	10g
NaCl	100g
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH= 7.2

• **Milieu ISP2 (International Streptomyces Project 2) à 15% NaCl**

Glucose	04g
Extrait de levure	04g
Extrait de malt	10g
NaCl	120 g
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH= 7.2

• Milieu Mannitol Mobilité Nitraté

Composition en g/l eau distillée

Peptone tryptique de viande	20g
Mannitol	02g
RP1 %	4 ml
Nitrate K	01g
Agar	04g

pH = 7,6 - 7,8

5. Milieux pour tests enzymatiques

• Gélose au lait écrémé

Peptone	10 g
NaCl	05 g
Extrait de levure	03 g
Agar	20g
Eau distillée	1000 ml

Lait écrémé 100 g dans 1000 ml d'eau distillée

• Gélose à la gélatine

Peptone	05 g	
Extrait de bœuf	03 g	
Gélatine	04 g	
Agar	15g	
Eau distillée	1000 ml	pH=7

• **Milieu de Sierra additionné de tween 80**

Peptone	10 g
NaCl	05 g
CaCl -1H O	0.1 g
Eau distillée	1000 ml
Agar	18 g
Tween 80	10 ml

pH=7.4

• **Gélose à l'amidon**

Amidon soluble	10g
Peptone	5g
Extrait de levure	3g
NaCl	5g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml

• **Milieu pour le test d'uréase**

Peptone	1g
Glucose	1g
NaCl	5g
Phosphate disodique (Na ₂ HPO ₄)	1.2 g
Rouge de phénol	0,012g

Urée (ajouter après stérilisation)	20g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

• **Gélose de la pectine**

Pectine	5 g
Extrait de levure	2 g
Glucose	1 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL

• **Gélose de la chitine**

Chitine	4 g
KH ₂ PO ₄	0.7 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
NaCl	1 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.001 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL

- **Coloration de Gram**

Réactifs fournis prêts à l'emploi

- Violet de gentiane

- Lugol

- Ethanol

- Fuschine

- **Protocole**

- A partir d'un prélèvement, un frottis est réalisé, séché à l'air et fixé à la chaleur, on recouvre la lame de violet de gentiane pendant une minute après la lame est ensuite rincée à l'eau distillée.

- On recouvre la lame de Lugol pendant une minute, on lave à l'eau distillée.

- On décolore à l'alcool jusqu'à la lame devient claire. On lave à l'eau distillé

- On recouvre la lame de fuchsine pendant 30 secondes à 1 minute. On lave à l'eau distillée. On sèche la lame entre deux feuilles de papier filtre.

- On observe la lame au microscope optique au grossissement.

