

وزارة التعليم العالي و البحث 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 de la Nutrition



MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER en :

Agroalimentaire et contrôle de qualité

Intitulé

Evaluation de l'activité biologique d'une bactérie extrêmophile.

Présenté par :

Mlle : AICHOUCHE Abir

Mlle : BELGHOUL Hafsa

Devant les membres de jury :

Présidente : Mme	FERRAG Dalila	Maître de conférence (B)	(U. Relizane)
Encadrante : Mme	SAIBI Amina Nour Elhouda	Maître de conférence (B)	(U. Relizane)
Examinatrice: Mme	BOUKHENNOUFA Asma	Maître de conférence (A)	(U. Relizane)

Année universitaire : 2025/2026

Remerciements :

*Nous tenons tout d'abord à exprimer notre profonde gratitude à notre encadrante, **Dr. SAIBI**, pour sa patience, sa disponibilité et la qualité de son suivi tout au long de ce projet de fin d'études. Ses conseils précieux nous ont permis de mener à bien ce travail de recherche.*

*Nos vifs remerciements vont également adressés aux membres du jury **Dr. FARRAG** pour l'honneur qu'elle nous fait de présider le jury et d'évaluer ce travail, et **Dr. BOUKHENNOUFA** pour l'honneur qu'elle nous fait d'avoir acceptée d'examiner ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à l'ensemble du personnel du **Laboratoire d'Hygiène de la Wilaya de Mostaganem**, et plus particulièrement au **Dr. BENDANI**, chef de laboratoire, pour son accueil chaleureux. Nous exprimons notre reconnaissance à toute l'équipe technique pour sa patience et son aide précieuse lors de nos manipulations expérimentales.*

Au terme de ce parcours universitaire, nous dédions ce travail à nos parents respectifs. Aucun mot ne saurait exprimer notre reconnaissance pour les sacrifices qu'ils ont consentis, leur soutien inconditionnel et leurs prières qui nous ont portées jusqu'ici.

Dédicaces :

*Au **Créateur Suprême**, source de toute science et de toute sagesse. aucun mot ni aucune parole ne sauraient exprimer la profondeur de ma gratitude pour Ses bienfaits infinis et pour m'avoir guidée et éclairée dans l'accomplissement de ce travail*

***À mon cher père**, mon modèle et mon idéal suprême dans ce monde. À celui qui m'a tant choyée et qui m'a fait voir la vie avec les yeux de la gloire. Tu as été comme une bougie qui a éclairé mon chemin, . Mon succès n'est rien devant la grandeur de tes sacrifices ; ou plutôt, c'est ton succès à toi, et non le mien, car je ne suis que le fruit de ce que tu as si précieusement semé*

***À celle qui est bien plus qu'une mère** : ma confidente, ma meilleure amie et mon âme sœur. À celle qui n'a jamais décliné le moindre de mes souhaits et dont l'unique désir était de voir sa fille unique réussir et s'épanouir. Maman chérie, ce succès est avant tout le tien ; c'est la concrétisation de tes prières et de ton dévouement infini.*

***À mes frères**, mes piliers et mes protecteurs. À ceux qui ont toujours été mon rempart et ma source de force. Grâce à votre soutien indéfectible. Vous êtes l'honneur qui m'accompagne et le précieux héritage qui fait ma grandeur*

***À mes chers cousins**, avec qui j'ai partagé l'innocence de l'enfance et les récits d'une vie. À ceux qui ont grandi à mes côtés, devenant bien plus que des proches : mes alliés les plus fidèles. Vous êtes une partie intégrante de mon parcours et de mes plus beaux souvenirs.*

***À mes amis**, ma binôme **Hafsa** et tous ceux qui m'ont accompagnée durant mon parcours académique. À ceux avec qui j'ai partagé les rêves et les grandes ambitions. Merci pour la sincérité de votre fidélité qui a fait de ce chemin une aventure inoubliable*

♥ **AICHOUCHE Abir** ♥

Dédicaces :

*Grâce au **Bon Dieu**, qui a guidé mes pas tout au long de mon cursus universitaire. Je le remercie de m'avoir entourée des bonnes personnes et de m'avoir éclairé le chemin de la science et du savoir.*

*À **mon père**, Pour tous les sacrifices consentis au quotidien afin de garantir ma réussite et l'éducation dont je suis fière aujourd'hui. Ta force silencieuse et ton soutien indéfectible ont tracé la voie de mon parcours universitaire.*

*À **ma mère**, Source d'amour inconditionnel et de patience infinie, dont les prières bienveillantes ont guidé chacun de mes pas. Tes sacrifices invisibles et ta tendresse constante ont été mon plus grand moteur tout au long de ce travail.*

*À mes **frères et sœurs**, Pour la complicité qui nous unit et les moments partagés. Merci d'être mon équilibre et ma source d'énergie .Une pensée toute particulière à notre petit **Chahine**, le cœur de la maison."*

*À ma meilleure amie **Sabrina**, Merci d'avoir été à mes côtés dans les bons comme dans les moments de doute. Ta présence, ton écoute et nos fous rires ont rendu ce parcours bien plus léger."*

*Enfin, ce travail est le fruit d'une collaboration étroite et d'une amitié sincère. Je tiens à remercier tout particulièrement ma binôme, **Abir**, pour son soutien constant, son sérieux et la motivation qu'elle a partagée avec moi durant toutes les étapes de ce mémoire. C'est ensemble, grâce à notre complémentarité, que nous avons pu relever ce défi.*

♥ BELGHOUL Hafsa ♥

Résumé

La richesse de la biodiversité issue des écosystèmes extrêmes constitue une source inestimable de molécules bioactives aux propriétés uniques. La capacité des microorganismes halophiles à synthétiser des métabolites possédant des propriétés fonctionnelles même en situation de stress osmotique extrême fait de ces souches des candidates de choix pour des innovations biotechnologiques, en particulier pour la production de biosurfactants et d'agents antimicrobiens.

Ce travail contribue à cette dynamique, à travers l'évaluation du potentiel biologique de l'isolat LMB3060 affilié au genre *Halomonas* isolé de la Grande Sebkhah d'Oran. Après une caractérisation phénotypique et biochimique approfondie (tests enzymatiques et galerie API 20E), la capacité de production de biosurfactant de la souche a été évaluée par le test de l'effondrement sur goutte, l'étalement de l'huile à une salinité de 10 % de NaCl ainsi que par l'indice d'émulsion (EI24). En parallèle, l'activité inhibitrice de l'isolat a été évaluée contre différentes souches pathogènes en utilisant la méthode des cylindres d'agar.

Les résultats des analyses montrent que le LMB3060 est un bacille mobile à Gram négatif, catalase et oxydase positifs. L'inactivité biosurfactante dans les conditions expérimentales choisies est contrebalancée par l'activité antibactérienne de la souche contre *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 5 mm. De ce fait, l'isolat présente un intérêt évident comme candidat potentiel pour l'extraction de molécules antimicrobiennes d'origine halophile, ouvrant la voie à de nouvelles perspectives en microbiologie appliquée.

Mots clés : Bactérie extrémophile, *Halomonas*, Grande Sebkhah d'Oran, activité antimicrobienne, biosurfactants.

Abstract

The diversity of biodiversity from extreme ecosystems is an invaluable source of bioactive molecules with unique properties. The ability of halophilic microorganisms to synthesize metabolites with functional properties even under extreme osmotic stress makes these strains candidates for biotechnological innovations, in particular for the production of biosurfactants and antimicrobials.

This study contributes to this dynamic, through the evaluation of the biological potential of isolate LMB3060 affiliated with the genus *Halomonas* isolated from the Great Sebkhah of Oran. After a thorough phenotypic and biochemical characterization (enzymatic tests and API 20E strip), the biosurfactant production capacity of the strain was evaluated by the drop collapse test, spreading the oil to a salinity of 10% NaCl as well as by the emulsion index (EI₂₄). In parallel, the inhibitory activity of the isolate was evaluated against different pathogenic strains using the agar cylinder method.

The results of the analyses show that LMB3060 is a Gram-negative, catalase and oxidase positive mobile bacilli. The biosurfactant inactivity under the selected experimental conditions is counterbalanced by the antibacterial activity of the strain against *Staphylococcus aureus* with an inhibition zone of 5 mm. Therefore, the isolate is of obvious interest as a potential candidate for the extraction of halophilic antimicrobial molecules, opening up new perspectives in applied microbiology.

Keywords: Extremophilic bacteria, *Halomonas*, Great Oran sebkhah, antimicrobial activity, biosurfactants.

ملخص

يعد التنوع البيولوجي للنظم البيئية المتطرفة مصدرًا لا يقدر بثمن للجزيئات النشطة بيولوجيًا ذات الخصائص الفريدة. إن قدرة الكائنات الحية الدقيقة المحبة للملوحة على تصنيع جزيئات ذات خصائص وظيفية حتى تحت الضغط الأسموزي الشديد تجعل هذه السلالات مرشحة واعدة للابتكارات التكنولوجية الحيوية، وخاصة لإنتاج المواد الخافضة للتوتر السطحي والمضادات الحيوية.

تساهم هذه الدراسة في هذه الديناميكية، من خلال تقييم الإمكانات البيولوجية للعزلة LMB3060 التابعة لجنس *Halomonas* والمعزولة من سبخة وهران الكبرى. بعد إجراء توصيف ظاهري وكيميائي حيوي شامل. ثم تم تقييم قدرة إنتاج المواد الخافضة للتوتر السطحي للسلالة وكذلك عن طريق اختبار انهيار القطرة، مؤشر المستحلب ونشر الزيت عند ملوحة تبلغ 10 % من كلوريد الصوديوم. وبالتوازي مع ذلك، تم تقييم النشاط المثبط للعزلة ضد سلالات بكتيرية مسببة للأمراض مختلفة باستخدام طريقة أسطوانة الأجار.

تظهر نتائج التحليلات أن السلالة LMB3060 عبارة عن عصية متنقلة، سالبة لصبغة غرام، وإيجابية الكاتلاز والأكسيداز. وفي حين لوحظ عدم نشاط المادة الخافضة للتوتر السطحي في ظل الظروف التجريبية المختارة. في المقابل تم تسجيل (*Staphylococcus*) نشاط مضاد للبكتيريا واضح للسلالة ضد المكورات العنقودية الذهبية مع تسجيل منطقة تثبيط بلغت 5 مم. بناءً على ذلك، تكتسي هذه العزلة أهمية واضحة كمرشح محتمل (*aureus*) لاستخراج الجزيئات المضادة للميكروبات المحبة للملوحة، مما يفتح آفاقاً جديدة في مجالات علم الأحياء الدقيقة التطبيقية والتكنولوجيا الحيوية.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا متطرفة، سبخة وهران الكبرى، نشاط مضاد للميكروبات.

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
API	Analytical Profile Index (galerie biochimique)
ARN 16S	Acide ribonucléique 16S (séquençage)
ATCC	American Type Culture Collection
CMC	Concentration Micellaire Critique
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DAP	Acide diaminopimélique
DO	Densité optique
E24 / EI24	Indice d'émulsion après 24 heures
EPS	Exopolysaccharides
GN	Gélose Nutritive
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
hMDH	Malate déshydrogénase halophile
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
KCl	Chlorure de potassium
LPS	Lipopolysaccharides
MDH	Malate déshydrogénase
MSSA	Methicillin-Sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Chlorure de sodium (sel)
NGIB	Next Generation Industrial Biotechnology
ONPG	Ortho-Nitrophényl- β -galactoside (test β -galactosidase)

PHA / PHB Polyhydroxyalcanoates / Polyhydroxybutyrate

pH	Potentiel hydrogène
p/v	Poids/volume (concentration)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SDS	Sodium dodécyl sulfate (témoin positif)
UFC	Unités formant colonies
v/v	Volume/volume
ADH	Arginine dihydrolase
CIT	Utilisation du citrate
GEL	Gélatinase (liquéfaction de la gélatine)
GLU	Glucose (utilisation)
H₂S	Production de sulfure d'hydrogène
IND	Production d'indole
LDC	Lysine décarboxylase
ODC	Ornithine décarboxylase
ONPG	β-galactosidase
TDA	Tryptophane désaminase
URE	Uréase
VP	Voges-Proskauer (production d'acétoïne)

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des stratégies d'osmorégulation (« Salt-out » et « Salt-in »).....	13
Figure 2: présentation schématique des outils de manipulation moléculaire et des applications industrielles chez le genre bactérien <i>Halomonas</i>	17
Figure 3: Vue d'ensemble de la production microbienne des biosurfactants, de leur nature chimique et de leurs domaines d'applications multifonctionnels. (Anoop R. Markande et <i>al.</i>)	20
Figure 4: Photo de la Grande Sebkha d'Oran (khaled hamzi ,2021).	22
Figure 5: Mise en valeur de la Sebkha d'Oran.....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 6: Protocole expérimental.....	23
Figure 7 : Résultat de l'aspect macroscopique des colonies de l'isolat LMB3060 après 24hr d'incubation à 37°C sur gélose nutritive à 10% de NaCL (p/v).	30
Figure 8 : observation microscopique (grossissement x100 à immersion) des cellules fixées de l'isolat LMB3060 après coloration de Gram après 24hr d'incubation à 37°C sur gélose nutritive à 10% de NaCL (p/v).	31
Figure 9 : résultats du drop collapse test des isolats et contrôle positif (SDS10%).	32
Figure 10 : résultats du oil spreading test : A. oil spreading obtenu avec le surnageant de l'isolat LMB3060 et B. oil spreading obtenu avec le SDS (témoin positif).	33
Figure 11 : résultats obtenus par le test de microplaque	33
Figure 12 : évaluation de l'indice d'émulsion (E24) du surnageant de l'isolat LMB3060	34
Figure 13: résultats de l'activité antimicrobienne de l'isolat LMB3060 avec les différents germes testés.	35

Liste des tableaux

Tableau 1 : Germes test de référence utilisés	28
Tableau 2: profil biochimique partiel de l'isolat LMB3060 obtenu par la galerie API® 20E.	32
Tableau 3: activité antimicrobienne de l'isolat LMB3060 vis-à-vis de différents germes de référence par la technique des cylindres d'agar.....	34

Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale 1

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I: les extremophiles

1. Définitions :..... 5

1.1. Extrêmophiles : 5

1.2. La classification des microorganismes extrêmophiles..... 6

1.2.1. Thermophiles : 6

1.2.2. Les microorganismes halophiles et halotolérants..... 7

1.2.3. Les microorganismes adaptés au pH (acidophiles et alcaliphiles) 8

1.2.4. Les microorganismes adaptés à la pression (Piézophiles)..... 8

1.2.5. Les microorganismes adaptés à la température 9

1.3. Les écosystèmes naturels des microorganismes halophiles et halotolérants . 9

1.4. Les mécanismes d'adaptation..... 10

1.4.1. L'adaptation par accumulation de KCl (Salt-in strategy ou High salt-in)..... 10

1.4.2. L'adaptation par productions ou accumulation de solutés organiques (les osmoprotecteurs) : « Compatible-solute strategy » ou « Low salt-in » 12

CHAPITRE II: les bactéries du genres *Halomonas*

1. Généralités..... 15

2. Répartition écologique des espèces du genre *Halomonas* 15

3. Potentiels biotechnologiques des espèces du genre *Halomonas*..... 16

3.1. Fabrication de Biopolymères (PHA/PHB) :	16
3.2. Production d'Ectoïne :	16
3.3. Bioremédiation :	17
3.4. Production d'Exopolysaccharides (EPS) :	17

CHAPITRE III: les biosurfactants

1. Généralités sur les biosurfactants	19
1.1. Définition et structure	19
1.2. Classification	19
1.2.1. Les glycolipides :	19
1.2.2. Les lipopeptides et lipoprotéines :	19
1.2.3. Les acides gras et phospholipides :	19
1.2.4. Les biosurfactants polymériques :	20
1.3. Propriétés et intérêts environnementaux	20

Matériel et méthodes

1. Le site de prélèvement ; La Grande Sebkha d'Oran	22
2. Origine, revivification et vérification de la pureté des souches	24
3. Caractérisation phénotypique et biochimique	24
3.1. Caractérisation phénotypique	24
3.2. Caractérisation biochimique	25
3.2.1. Système API® 20E.....	25
3.2.2. Mise en évidence de la catalase	25
3.2.3. Mise en évidence de la cytochrome-oxydase	26
4. Screening de la production des biosurfactants	26
4.1. Préparation des surnageants	26
4.2. Méthodes de screening des biosurfactants	26
4.2.1. Drop collapse test (test d'effondrement de la goutte)	26
4.2.2. Oil spreading test (test de diffusion de l'huile).....	26

4.2.3. Test en microplaque (Optical distortion grid assay)	27
4.2.4. Indice d'émulsion (E24)	27
5. Activité antimicrobienne	28
5.1. Préparation des souches de références	28
5.2. Standardisation des inocula des germes test	28
5.3. La technique des cylindres d'agar	29

Résultats et discussion

1. Résultats	30
1.1. Caractérisation phénotypique et biochimique.....	30
1.1.1. Observation microscopique et macroscopique de l'isolats LMB3060	30
1.2. Résultats du screening de l'activité biosurfactant.....	32
1.2.1. Test d'effondrement de la goutte (Drop collapse test)	32
1.2.2. Test de diffusion de l'huile (Oil spreading test).....	32
1.2.3. Test de microplaque (Optical distortion grid assay)	33
1.2.4. Indice d'émulsion (E24)	33
1.3. Résultats du Screening de l'activité antimicrobienne.....	34
2. Discussion :	36
Conclusion et perspectives.....	47
Liste des Références Bibliographiques.....	51

Introduction générale

Introduction générale

Dans le contexte actuel de transition écologique, les biotechnologies microbiennes s'imposent comme un levier stratégique pour concevoir des solutions durables et respectueuses de l'environnement. Au cœur de cette dynamique, les biosurfactants se distinguent comme des métabolites d'origine biologique aux performances remarquables. Ces molécules amphiphiles, capables de modifier les tensions aux interfaces, suscitent un engouement croissant car elles pallient les limites des tensioactifs de synthèse. Leur supériorité repose sur une biodégradabilité optimale, une toxicité quasi nulle et une efficacité maintenue même sous des conditions de salinité, de pH ou de température extrêmes (Sohail et Jamil, 2023 ; Rizvi et *al.*, 2024).

Toutes ces propriétés rendent les biosurfactants particulièrement attractifs pour des applications dans de nombreux secteurs industriels, notamment en pharmacie et en médecine, où certains présentent des effets antitumoraux, cicatrisants et surtout antimicrobiens. Dans un contexte marqué par l'émergence de la résistance bactérienne, la recherche de nouvelles molécules capables d'inhiber des pathogènes devient une priorité. Les biosurfactants, par leur capacité à déstabiliser les membranes cellulaires, constituent une alternative sérieuse aux antibiotiques conventionnels contre des souches cliniques et environnementales (Naughton et *al.*, 2019 ; Sarubbo et *al.*, 2022).

Les écosystèmes salins et hypersalins représentent une niche écologique pouvant héberger une grande diversité de microorganismes halophiles et halotolérants particuliers, présentant une source potentielle de métabolites originaux (Edbeib et *al.*, 2016). Les bactéries du genre *Halomonas* sont parmi les microorganismes isolés de tels milieux extrêmes. Elles offrent un avantage compétitif majeur en raison de leur résistances, leur permettant de s'adapter à la salinité (Horikoshi, 2008). Ces bactéries sont rapportées pour leur aptitude à produire des biosurfactants tels que des glycolipides, lipopeptides (viscosine, halosurfactine) et des polymères émulsifiants, possédant des spectres d'action très larges contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Mondol et *al.*, 2013 ; Kumar et *al.*, 2020).

Introduction générale

Les objectifs de ce mémoire sont : identifier et étudier la production de biosurfactants par l'isolat bactérien affilié au genre *Halomonas*, issus de la Grande Sebkhah d'Oran, conservé au laboratoire L.A.M.A.A.B.E de l'Université de Tlemcen), et évaluer son potentiel inhibiteur vis-à-vis d'une gamme diversifiée de micro-organismes pathogènes. Cette étude vise à tester l'efficacité de ces métabolites contre des souches d'intérêt médical telles que *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* et *Bacillus cereus*.

La démarche expérimentale s'est articulée autour des étapes suivantes :

- **Revivification et vérification** de la pureté de la souche.
- **Screening de la production** des biosurfactants par des tests qualitatifs (drop collapse, oil spreading...) et quantitatifs (indice d'émulsion E24) à une concentration saline de **10% de NaCl (p/v)**.
- **Évaluation de l'activité antimicrobienne** par la méthode de diffusion en milieu solide afin de déterminer le spectre d'action des métabolites face aux différents pathogènes cibles.

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I :

Les extrêmophiles

1. Définitions :

1.1. Extrêmophiles :

La vie microbienne ne se limite pas à des environnements spécifiques. Il est donc devenu clair que les communautés microbiennes existent dans des conditions les plus diverses (Burg, 2003). Les environnements extrêmes contiennent des conditions auxquelles il est difficile de survivre dans la plupart des formes de vie. Ces conditions comprennent des milieux naturels : déserts, roches hyper arides, fonds océaniques, lacs salés et volcans (Jorquera, 2019).

Extrêmophiles terme défini par Mac Elroy en 1974, sont des organismes qui peuvent survivre dans des conditions mortelles et dures, elles se trouvent partout sur Terre, dans des zones hyperthermales, régions acides/alcalines, zones de radiation...etc, sont capables à se multiplier dans des environnements et des milieux extrêmes : (pH, haute salinité, haute température °C ...etc).

L'intérêt des scientifiques pour les extrêmophiles provient également de leur contribution en tant que source importante de diversité génétique, de métabolismes particuliers et de biomolécules qui leur permettent de survivre à différents stress environnementaux. De plus, les enzymes produites par les extrêmophiles, appelées extrémozymes, ont la faculté d'opérer de manière optimale dans les conditions environnementales où ces micro-organismes habitent (Kour et *al.*, 2019).

En effet, ces extrêmophiles se caractérisent par leur richesse enzymatique précieuse. Cette situation s'explique en partie par la demande restreinte d'enzymes résistantes au sel dans la production actuelle ou les procédés associés (Kour et *al.*, 2019). Molécules essentielles ; les enzymes régulent des milliers de réactions dans les organismes vivants. Les micro-organismes choisis dans des milieux extrêmes sont devenus des atouts intéressants pour découvrir de nouvelles « extrémoenzymes » présentant une résistance à la dénaturation et une excellente stabilité thermique ; mais également une stabilité exceptionnelle face aux solvants alcalins et organiques ; ce qui en fait d'excellents candidats pour des usages industriels d'Ouargla, en 2018 par Khallef et *al.*

1.2. La classification des microorganismes extrêmophiles

Les classifications des extrêmophiles est faites selon leur différentes particularités et on distigue :

1.2.1. Thermophiles :

Les premières espèces sont découvertes en (1960), «*Thermus aquaticus*», une bactérie filamenteuse isolé par « Brock et ses collaborateurs », se développent à 70° C dans le parc national de Yellow-Stone en Etats-Unis.

Les thermophiles constituent un sous-groupe qui prospère à des températures élevées allant de 41 à 122 °C (106 à 252 °F) (Madigan et *al.*, 2006). Leurs mécanismes d'adaptation comprennent des parois cellulaires protectrices, des protéines de choc thermique, des osmoprotecteurs, des enzymes spécialisées et des systèmes de réparation de l'ADN, qui leur permettent de survivre et de fonctionner à des températures élevées (Rothschild et Mancinelli, 2001). Les thermophiles sont classés en thermophiles modérés (croissance optimale entre 50 et 60 °C), thermophiles extrêmes (60 à 80 °C) et hyperthermophiles (80 à 110 °C) (Rampelotto, 2013 ; Valenzuela et *al.*, 2024).

L'intérêt pour les micro-organismes thermophiles a explosé depuis l'isolement de la première enzyme thermostable, l'isoleucyl-ARNt synthétase, à partir de *Bacillus stearothermophilus* en 1972 (Bertoldo et Antranikian, 2002). Ces organismes produisent des enzymes thermostables essentielles pour les applications industrielles, notamment les cellulases, les amylases, les chitinases, les protéases, les lipases, les xylanases, les estérases, les phytases, les pectinases et les ananases (Dumorné et *al.*, 2017).

Des bactéries thermophiles comme *Geobacillus* et *Alicyclobacillus*, *Anoxybacillus*, *Pyrococcus* et *Thermococcus* grâce à leur aptitude à se développer à des températures élevées, ont prouvé être de puissants candidats pour le rôle de biocatalyseurs (Atalah et *al.*, 2019).

Les composés antimicrobiens, généralement élaborés par des micro-organismes, freinent la prolifération d'autres microbes. Les bactéries du sol jouent un rôle clé dans la production de ces premiers antibiotiques, mais leur efficacité a été réduite par la résistance, ce qui crée une

demande pressante de nouvelles sources d'agents antimicrobiens (Salem et *al.*, 2021). Face à l'accroissement des souches résistantes aux antibiotiques, une quête constante de nouveaux agents antimicrobiens, notamment d'origine extrêmophile, est indispensable (Mahajan et Balachandran, 2017).

Selon Muhammad et *al.* (2009), les thermophiles ont prouvé leur aptitude à générer des agents antimicrobiens puissants contre une variété de micro-organismes, y compris des bactéries, champignons et protozoaires.

1.2.2. Les microorganismes halophiles et halotolérants

Les halophiles : Un micro-organisme halophile est défini de manière opérationnelle comme un organisme qui montre une croissance considérable à des concentrations de sel supérieures à 100g/l, ils vivent dans des environnements hypersalins (DasSarma et Arora, 2001). Ils se trouvent dans les trois domaines de la vie :Archaea, Bacteria et Eucarya. L'ordre des *Halobacteriales* avec une seule famille, les *Halobacteriaceae*, est entièrement constitué d'halophiles, où se trouvent les micro-organismes les plus exigeant et tolérants au sel. Les études les plus approfondies ont été faites sur cette famille, qui peuvent être considérées comme des halophiles par excellence en raison de leur dépendance stricte a des concentrations élevées de sel pour la croissance et la stabilité structurelle.

La catégorisation des microorganismes dans les environnements salins est basée sur leur nécessité en NaCl. Les halophiles extrêmes nécessitent une concentration en sel allant de 15 % à 30 %. Les halophiles modérés se développent dans une salinité de 3 % à 15 %, tandis que les halophiles faibles prospèrent dans une salinité de 1 % à 3 %. En revanche, les organismes halotolérants n'ont pas besoin de sel pour survivre, mais peuvent tolérer jusqu'à 25 % de NaCl. (Ait Bachir et Asli, 2020).

Ces entités, qui se trouvent dans les trois sphères de l'existence, colonisent des environnements tels que les lacs à haute salinité grâce à leurs biomolécules uniques (Ait Bachir et ASLI, 2020).

Les bactéries halotolérantes extraites des sebkhas démontrent une forte robustesse, tolérant des températures allant de 30 à 50 °C. Elles génèrent des enzymes extracellulaires actives (lipases, cellulases), attestant de leur grand potentiel en biotechnologie (Mezani, 2022).

Finalement, le genre *Halorubrum* génère des exoenzymes qui demeurent stables dans des conditions de salinité élevées (20-25 % NaCl) et pH alcalin, mettant en évidence une spécialisation poussée (Rabouhi et Benbrahim 2022).

1.2.3. Les microorganismes adaptés au pH (acidophiles et alcaliphiles)

Il s'agit de la division des extrêmophiles sur la base de la valeur du pH. Les **acidophiles** profitent du milieu à valeur faible du pH (entre 1 et 5) tandis que les **alcaliphiles** survivent dans les endroits avec une valeur pH très élevée. Ces espèces maintiennent la valeur de pH proche de la neutralité grâce aux barrières membranaires complexes et des systèmes de transport de protons exigeants (Gregoire et *al.*, 2009). Mais, il existe des exemples de l'organisme qui tirent leurs vies en doublement. Dans le cas du genre *Halorubrum*, l'organisme est alcaliphile, mais en même temps, il tire son énergie de la plénitude de sel. Pourtant, tous ses enzymes voient leur stabilité et leur fonctionnalité avec le pH s'élève à 7,2-10 (Rabouhi et Benbrahim, 2022).

1.2.4. Les microorganismes adaptés à la pression (Piézophiles)

Les **piézophiles** sont des microorganismes adaptés aux hautes pressions des profondeurs. On distingue les piézophiles stricts, qui exigent des pressions élevées (souvent > 40 MPa) pour croître, et les piézotolérants, capables de supporter des pressions allant de 0,1 MPa à 50 MPa. Pour résister à la compression, ils modifient la composition en acides gras de leur membrane afin d'en maintenir la fluidité. (Oger et Cario, 2014).

Dans les sources hydrothermales, l'archée *Thermococcus barophilus* vit dans des conditions **piézo-hyperthermophiles**. Elle nécessite une pression de 40 MPa et une température de 85°C pour son développement, adaptant son expression génétique pour stabiliser son métabolisme. (Birien, 2018).

1.2.5. Les microorganismes adaptés à la température

La classification thermique se base sur la température idéale de croissance : les **psychrophiles** (moins de 15 °C), les **thermophiles** (45 °C à 80 °C) et les **hyperthermophiles** (plus de 80 °C). Ces organismes détiennent des protéines extrêmement stables et des membranes constituées de liaisons éther (dans le cas des Archées), ce qui les protège contre la dénaturation cellulaire sous des températures extrêmes. (Gregoire et *al.*, 2009).

L'étude de lieux tels que la source d'eau chaude Hammam Debbagh, où l'eau atteint plus de 90 °C, met en évidence la présence dominante de bactéries thermophiles résistantes. Ces organismes génèrent des enzymes qui demeurent actives même après 72h à 55°C, ce qui est d'une grande importance pour les procédés industriels à haute température (Cisse et Moussa, 2023).

1.3. Les écosystèmes naturels des microorganismes halophiles et halotolérants

L'eau de mer qui représente la plus grande partie de l'eau sur Terre, contient des sels minéraux en concentration remarquablement constante dont les principaux sont les chlorures (18,98 %), le sodium (10,56 %), différentes formes de sulfates (2,65 %), du magnésium (1.27%), du calcium (0,4%), du potassium (0,38 %) et des carbonates (0.14%) mer (Blatt et *al.*, 1980 ; Rodriguez-Valera et *al.*, 1985 ; Hamdi Sekoura, 2019).

Dans les environnements thalassohalins, (du grec thalasso, mer) l'eau de mer est concentrée par évaporation. Tous les sels présents augmentent leurs concentrations dans les mêmes proportions jusqu'au seuil de précipitation. Les carbonates précipitent sous forme de carbonates de Ca^{2+} dès que la salinité atteint 6 %. Le sulfate précipite et forme des dépôts de gypse (sulfate de Ca^{2+}) dès que la salinité dépasse 10%. Au-delà de 25 %, le NaCl commence à précipiter sous forme d'halite et précipite pleinement à 34 %. Les eaux sont par la suite 10 enrichies en ions Mg^{2+} et K^{+} dont les sels précipitent à des salinités 20 fois supérieures à celle de l'eau de mer (Blatt et *al.*, 1980 ; Rodriguez-Valera et *al.*, 1985 ; Hamdi Sekoura, 2019).

La majorité des milieux hypersalés ont pour origine les sels de l'eau de mer, soit directement par évaporation et concentration, soit indirectement par la dissolution des dépôts

fossiles que l'on retrouve sous forme d'évaporites. Les sets minéraux seront donc dans des proportions semblables à ceux contenus dans l'eau de mer, du moins tant que les seuls de précipitation ne seront pas atteints (Oren, 2002).

Les eaux hypersalées formées par évaporation partielle de l'eau de mer sont dites thalasshalines alors que celles obtenues par la dissolution des dépôts salés fossiles sont qualifiées de sthalasshalines. Ces dernières peuvent avoir des proportions en sets bien différentes de celles de l'eau de mer en fonction de la nature des dépôts. Certaines contiennent un fort pourcentage de carbonate de sodium et sont très alcalines (milieux natronés). Ces systèmes hypersalés sont d'origine continentale puisque qu'ils sont générés par dissolution, après action des eaux de pluies ou des eaux de ruissellements, des sels contenus dans les roches ou des couches géologiques traversées. Ces sels sont alors concentrés lorsque ces eaux se trouvent accumulées dans des bassins imperméables. Dans ce cas, chaque lac salé est unique de par sa composition chimique. On classe ces lacs en deux catégories selon Fanion qui prédomine : les lacs sulfatés et les lacs contenant du carbonate comme les lacs alcalins de l'est africain. Si dans les premiers environnements une flore ubiquiste peut être trouvée, les seconds présentent souvent une biodiversité restreinte et spécifique de son biotope (Oren, 2002).

Les marais salants sont également un habitat des procaryotes halophiles extrêmes. Ce sont des petits bassins fermés remplis d'eau de mer et qui, par suite de l'évaporation, conduisent à la production de sel. au cours des trois dernières décennies, des fosses profondes, hypersalées et anoxiques, ont été découvertes en Méditerranée Orientale. Certains sols contiennent également des teneurs en sels suffisamment élevées pour être qualifiés d'hypersalés . (Cayol et *al.*, 2011).

1.4. Les mécanismes d'adaptation

1.4.1. L'adaptation par accumulation de KCl (Salt-in strategy ou High salt-in)

Les halophiles ont développé deux différentes stratégies d'adaptation pour faire face à la pression osmotique induite par la forte concentration en NaCl du milieu. La première, utilisée par les Archées halophiles aérobies de la famille Halobacteriaceae et les bactéries halophiles anaérobies de l'ordre des Halanaerobiales implique l'accumulation de concentrations molaires

de KCl (Kerker, 2004). Cette stratégie nécessite une adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire. Les protéines doivent conserver leur propre conformation et activité à des concentrations salines quasi-saturantes. Les protéines halophiles sont riches en acides aminés acides qui confèrent une charge négative en surface. Ces protéines interagissent avec les ions de chlorure et de sodium pour former des ponts en sel (Richard et *al.*, 2000), qui se dénaturent à de faibles teneurs en sel.

Accumulation de KCl une stratégie impliquant l'accumulation d'ions K^+ et Cl^- pour maintenir l'équilibre osmotique chez les halophiles. Elle est adoptée par les archées aérobies halophiles de l'ordre des Halobacteriales accumulent le KCl à des concentrations aussi moins élevées que la concentration du NaCl dans leur milieu environnant (Oren, 2000). Dans le domaine des Bactéries, cette stratégie «salt-in» a jusqu'à présent été uniquement montrée dans un groupe, l'ordre Halanaerobiales, qui se compose des anaérobies fermentatifs ou homoacétogènes (Oren, 1999). Cependant, la présence de concentrations élevées du KCl dans le cytoplasme nécessite des adaptations profondes de toutes protéines pour permettre à tous les systèmes enzymatiques intracellulaires d'être actifs à haute teneur en sel (Oren, 2002). Pour atteindre la tolérance au sel, les protéines halobactériennes ont subi de nombreuses substitutions d'acides aminés, impliquant l'enrichissement en aspartyle, glutamyle et les résidus faiblement hydrophobes. La malate déshydrogénase halophile (hMDH) d'*Halobacterium marismortui*, par exemple, présente un excès de 20% en moles de résidus acides par rapport aux résidus basiques, contre seulement 6% en moles dans son équivalent non halophile. Ces modifications peuvent être expliquées par la nécessité d'attirer une coquille d'hydratation dans un environnement où l'activité de l'eau est faible (Sleator et Hill, 2002).

Les micro-organismes extrêmement halophiles qui accumulent du KCl pour maintenir leur équilibre osmotique (Halobacteriaceae , *Salinibacter*) présentent un large excès d'acides aminés acides dans leurs protéines. Cette mini-synthèse explore la présence de protéomes acides chez les halophiles de physiologie et d'appartenance phylogénétique diverses. Un protéome acide a été prédit pour les bactéries fermentaires de l'ordre des Halanaerobiales , connues pour accumuler du KCl. Cependant, cette hypothèse n'est pas confirmée par l'analyse du génome. L'excès d'acides aminés acides observé est dû à une forte teneur en Gln et Asn, qui

libèrent du Glu et de l'Asp par hydrolyse acide. Les espèces étroitement apparentées *Halorhodospira halophila* et *Halorhodospira halochloris* utilisent des stratégies différentes pour s'adapter à une forte salinité. La première possède un protéome acide et accumule de fortes concentrations de KCl en milieu hypertonique ; la seconde n'accumule pas de KCl et ne possède pas de protéome acide. Il est possible de prédire les protéomes acides à partir des génomes de certaines bactéries aérobies modérément halophiles qui accumulent des solutés osmotiques organiques (*Halomonas elongata* , *Chromohalobacter salexigens*) et de certaines bactéries marines. Grâce aux informations obtenues sur les espèces cultivées, il est possible de comprendre les profils de pI prédits à partir de données métagénomiques provenant d'environnements hypersalins (Antón, et *al.*, 2002).

1.4.2. L'adaptation par productions ou accumulation de solutés organiques (les osmoprotecteurs) : « Compatible-solute strategy » ou « Low salt-in »

Le milieu marin est le principal réservoir de biodiversité et les micro-organismes marins sont reconnus comme de riches sources de nouveaux composés. Récemment, on observe un intérêt accru pour l'étude des halophiles marins, dans le but de fournir des informations sur la diversité microbienne et leur rôle dans les cycles biogéochimiques des écosystèmes marins, ainsi que d'exploiter leur capacité à produire de nouvelles enzymes et des substances bioactives importantes sur le plan industriel, telles que des biosurfactants, des substances polymériques extracellulaires (EPS) et d'autres métabolites/composés essentiels pour des applications biotechnologiques (Bharali et *al.*, 2022).

Un grand nombre de bactéries halophiles présentent une forte concentration de K⁺ à l'intérieur de leurs cellules, ce qui leur confère un potentiel négatif interne. Pour survivre à des concentrations élevées de sel, les anions organiques (solutés chargés négativement) sont employés pour équilibrer l'environnement interne. Des bactéries halophiles comme *Halomonas* fabriquent généralement de l'éctoïne, tandis qu'*Halobacterium* a la capacité de synthétiser du L-glutamate en tant qu'osmolyte (Tanimura et *al.*, 2016). Ces solutés anioniques organiques possèdent un groupe carboxyle qui confère une charge négative, ou peuvent inclure des groupements sulfate ou phosphate (Pinar et *al.*, 2014). Les halobactéries et les méthanogènes

intensifient leur production de glutamate à mesure que les concentrations de sel externes s'accroissent. Le glutamate portant une charge négative s'accumule à des niveaux similaires à la concentration de K^+ à l'intérieur des cellules (Rajan et *al.*, 2008 ; Borjian et *al.*, 2016).

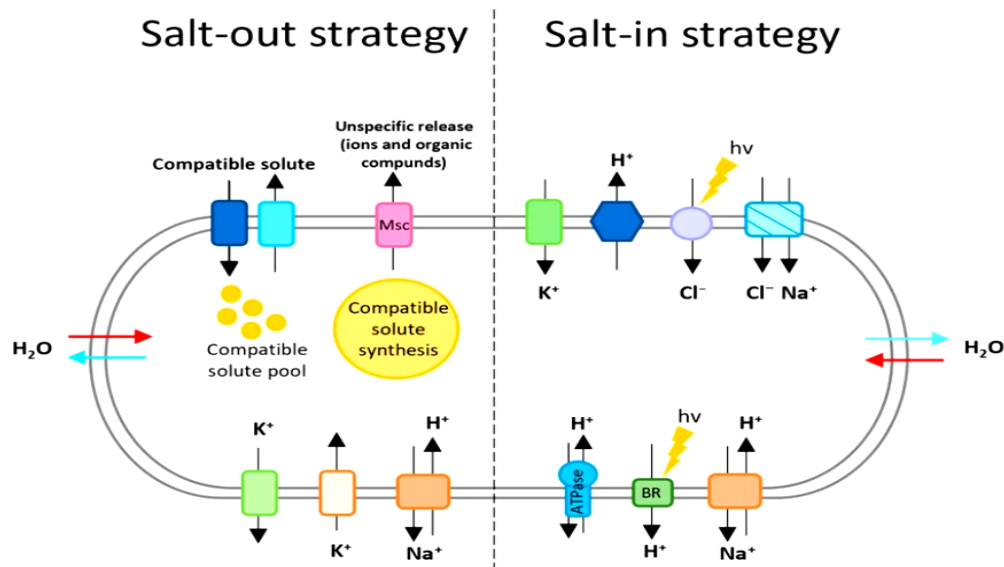


Figure 1 : Représentation schématique des stratégies d'osmorégulation (« Salt-out » et « Salt-in »)

CHAPITRE II :

Les bactéries du genre

Halomonas

1. Généralités

le genre *Halomonas* comprenait 91 espèces reconnues (Parte, 2016). Les espèces du genre *Halomonas* sont en forme de bâtonnet (à l'exception d'*Halomonas halodenitrificans*), ne forment pas d'endospores et nécessitent des concentrations de NaCl de 3 à 15 % (p/v) pour une croissance optimale. Les *Halomonas* spp. sont des bactéries Gram négatif appartenant à la famille des halophiles, qui se développent de préférence dans des environnements salins (contenant généralement du NaCl ou du KCl), tels que les lacs et marais salés, les océans ou d'autres zones salines terrestres (Setati et al., 2010).

Selon leur concentration en sel optimale pour leur croissance, les *Halomonas* spp. sont généralement divisées en deux sous-types : les *Halomonas* modérés (3–15 % NaCl m/v) et les *Halomonas* extrêmes (> 20 % NaCl m/v)

Colwell et al. (1994) ont comparé la relation entre un groupe de bactéries halophiles et de bactéries halotolérantes fraîchement isolées et un grand nombre de souches de laboratoire d'*Halobacterium*. Les auteurs ont constaté que les souches d'*Halobacterium* fraîchement isolées et les souches de laboratoire étaient très proches. Les souches bactériennes halotolérantes, bien qu'étroitement apparentées entre elles, présentaient très peu de similitudes avec les cultures halophiles. Cette situation a incité à un examen plus approfondi de ce groupe de bactéries halotolérantes.

2. Répartition écologique des espèces du genre *Halomonas*

Les espèces du genre *Halomonas* se retrouvent partout dans les milieux salins à l'échelle mondiale, prouvant une capacité d'adaptation hors du commun.

Environnements marins et hypersalins : On les retrouve dans les marais salants, les lacs au pH élevé (par exemple le Lac Magadi) ainsi que dans les zones littorales (Mata et al., 2002).

Milieux extrêmes : Certaines espèces ont été trouvées dans des sources hydrothermales profondes, des glaces de l'Antarctique ou des terrains pollués par des métaux lourds (Kaye et Baross, 2000).

Hôtes biologiques : Elles peuvent parfois être liées à des organismes marins tels que les algues et les éponges, ayant une importance dans le cycle du carbone et de l'azote (Kim et *al.*, 2013).

3. Potentiels biotechnologiques des espèces du genre *Halomonas*

L'étude des halophiles/haloalcaliphiles est motivée par leur rôle crucial dans l'écologie des environnements salins et leur application dans différents secteurs industriels (Rothschild et Mancinelli, 2001 ; Karan et *al.*, 2012). Les halophiles/haloalcaliphiles peuvent être utilisés comme source de plusieurs biomolécules uniques, comme des enzymes durables, des biopolymères, des solutés compatibles, des exo-polysaccharides et des lipides distinctifs, sans oublier les pigments caroténoïdes et les protéines rétinienne. Ils peuvent aussi servir dans les processus de bioremédiation, biofermentation et biodégradation des polluants toxiques (Peyton et *al.*, 2004 ; Dawson et *al.*, 2012), la désalinisation des eaux résiduaires ainsi que d'autres nouvelles applications en matière d'agriculture et de médecine (DasSarma et *al.*, 2010).

En raison de sa solidité, le genre *Halomonas* est considéré comme une « usine cellulaire » prometteuse.

3.1. Fabrication de Biopolymères (PHA/PHB) :

Halomonas bluephagenesis est employée dans la production de polyhydroxyalcanoates (plastiques biodégradables) en conditions de « Next Generation Industrial Biotechnology » (NGIB), une méthode qui n'exige pas de stérilisation grâce à la forte salinité (Chen et Jiang, 2018).

3.2. Production d'Ectoïne :

Employée en cosmétique et en pharmacie pour ses capacités à protéger les cellules contre le stress osmotique et thermique, l'ectoïne est fabriquée industriellement grâce à des « cultures bactériennes » d'*Halomonas elongata* (Sauer et Galinski, 1998).

3.3. Bioremédiation :

Aptitude à décomposer les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et à neutraliser les métaux lourds dans des conditions salines où les bactéries standards ne réussissent pas (Mnif et *al.*, 2009).

3.4. Production d'Exopolysaccharides (EPS) :

Halomonas maura génère le « maurane », un polymère aux caractéristiques.

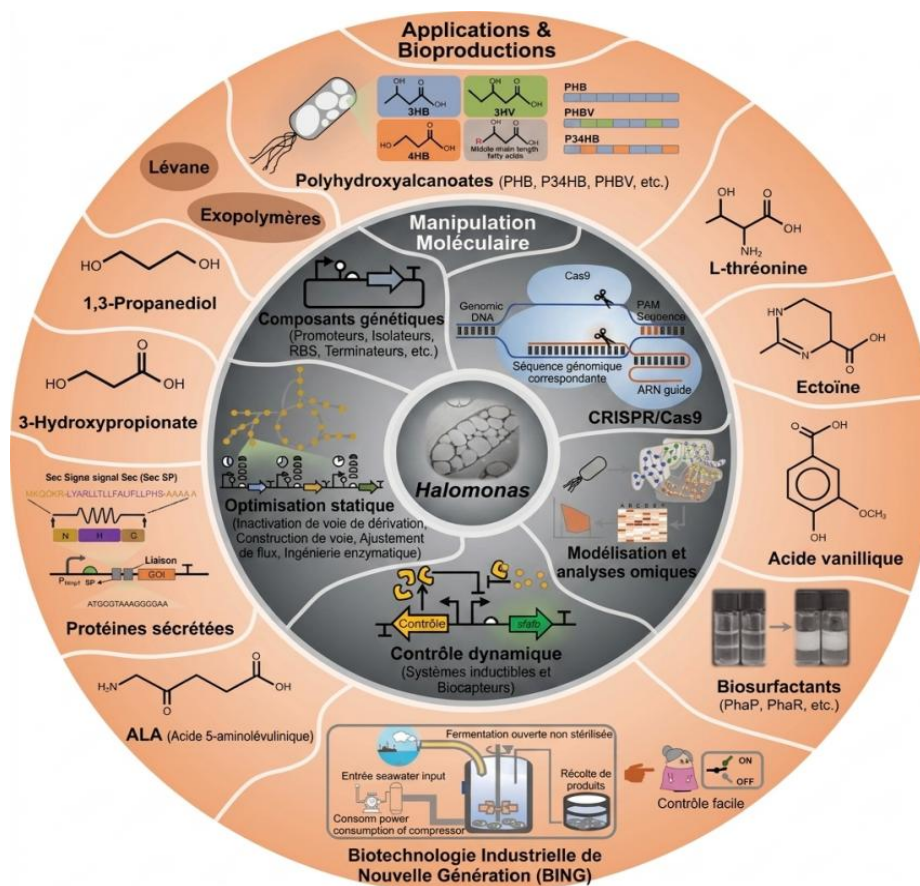


Figure 2: présentation schématique des outils de manipulation moléculaire et des applications industrielles chez le genre bactérien *Halomonas*

CHAPITRE III : Les biosurfactants

1. Généralités sur les biosurfactants**1.1. Définition et structure**

Les biosurfactants sont des composés amphiphiles produits par une grande diversité de micro-organismes, incluant les bactéries, les levures et les champignons (Belhaoudjeb et Arar, 2018). Selon Boudoune et Boualem (2018), leur structure est définie par la présence simultanée de deux parties : une tête hydrophile (polaire) et une queue hydrophobe (apolaire). La partie hydrophile peut être composée de sucres, d'acides aminés ou de phosphates, tandis que la partie hydrophobe est généralement constituée de chaînes d'acides gras (Belhaoudjeb et Arar, 2018). Cette double nature leur confère la capacité de s'accumuler aux interfaces et de réduire les tensions superficielles et interfaciales (Boudoune et Boualem, 2018).

1.2. Classification

La classification des biosurfactants est principalement basée sur leur structure chimique et leur origine microbienne. On distingue les catégories suivantes :

1.2.1. Les glycolipides :

Ce sont les plus courants, comprenant les rhamnolipides et les sophorolipides (Boudoune et Boualem, 2018).

1.2.2. Les lipopeptides et lipoprotéines :

Comme la surfactine, réputée pour son fort pouvoir tensioactif (Belhaoudjeb et Arar, 2018).

1.2.3. Les acides gras et phospholipides :

Produits par certaines bactéries lors de la croissance sur hydrocarbures (Boudoune et Boualem, 2018).

1.2.4. Les biosurfactants polymériques :

Tels que l'émulsane, qui sont des molécules de haut poids moléculaire (Belhaoudjeb et Arar, 2018).

1.3. Propriétés et intérêts environnementaux

Les biosurfactants présentent des caractéristiques physico-chimiques remarquables, notamment une Concentration Micellaire Critique (CMC) faible, ce qui signifie qu'ils sont efficaces même à de petites doses (Belhaoudjeb et Arar, 2018). Par rapport aux tensioactifs chimiques, ils offrent des avantages écologiques majeurs : une biodégradabilité élevée, une faible toxicité et une excellente stabilité face aux variations de température, de pH et de salinité (Boudoune et Boualem, 2018). Ces propriétés les rendent particulièrement utiles dans les processus de bioremédiation pour favoriser la dégradation des hydrocarbures dans les milieux pollués (Belhaoudjeb et Arar, 2018). et celles-ci parmi leur propriétés environnementaux (Figure 3)

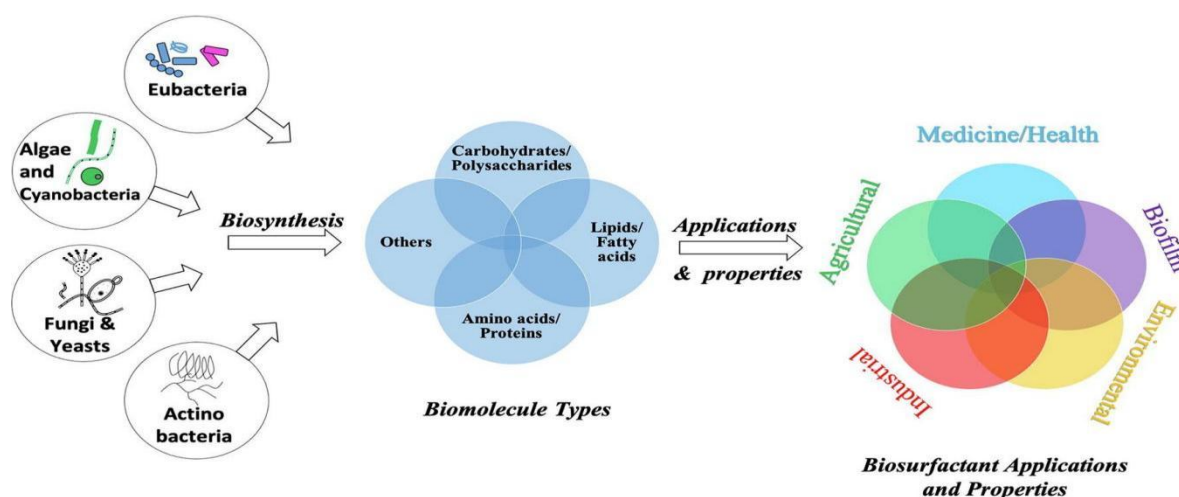


Figure 3: Vue d'ensemble de la production microbienne des biosurfactants, de leur nature chimique et de leurs domaines d'applications multifonctionnels. (Anoop R. Markande et *al.*)

Matériel et Méthodes

L'ensemble de ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Ahmed Zabana (Relizane).

1. Le site de prélèvement ; La Grande Sebkhia d'Oran

C'est un Lac situé à 15 km au Sud d'Oran dans la commune de Misserghin et distante de 12 km de la mer, visible juste après le décollage de l'aéroport d'Es Senia (Ahmed Ben Bella). Cette sebkha forme une dépression fermée, à 110 mètres d'altitude, limitée au Nord par le massif du Murdjajo et au Sud par celui de Tessala. Elle occupe le fond de cette dépression, présentant une topographie apparemment plane, mais légèrement inclinée vers l'Ouest, avec un point bas à 80 mètres d'altitude, et un point haut à 82 mètres (khaled hamzi ,2021).



Figure 4 et 5: Photo de la Grande Sebkhia d'Oran (khaled hamzi ,2021).

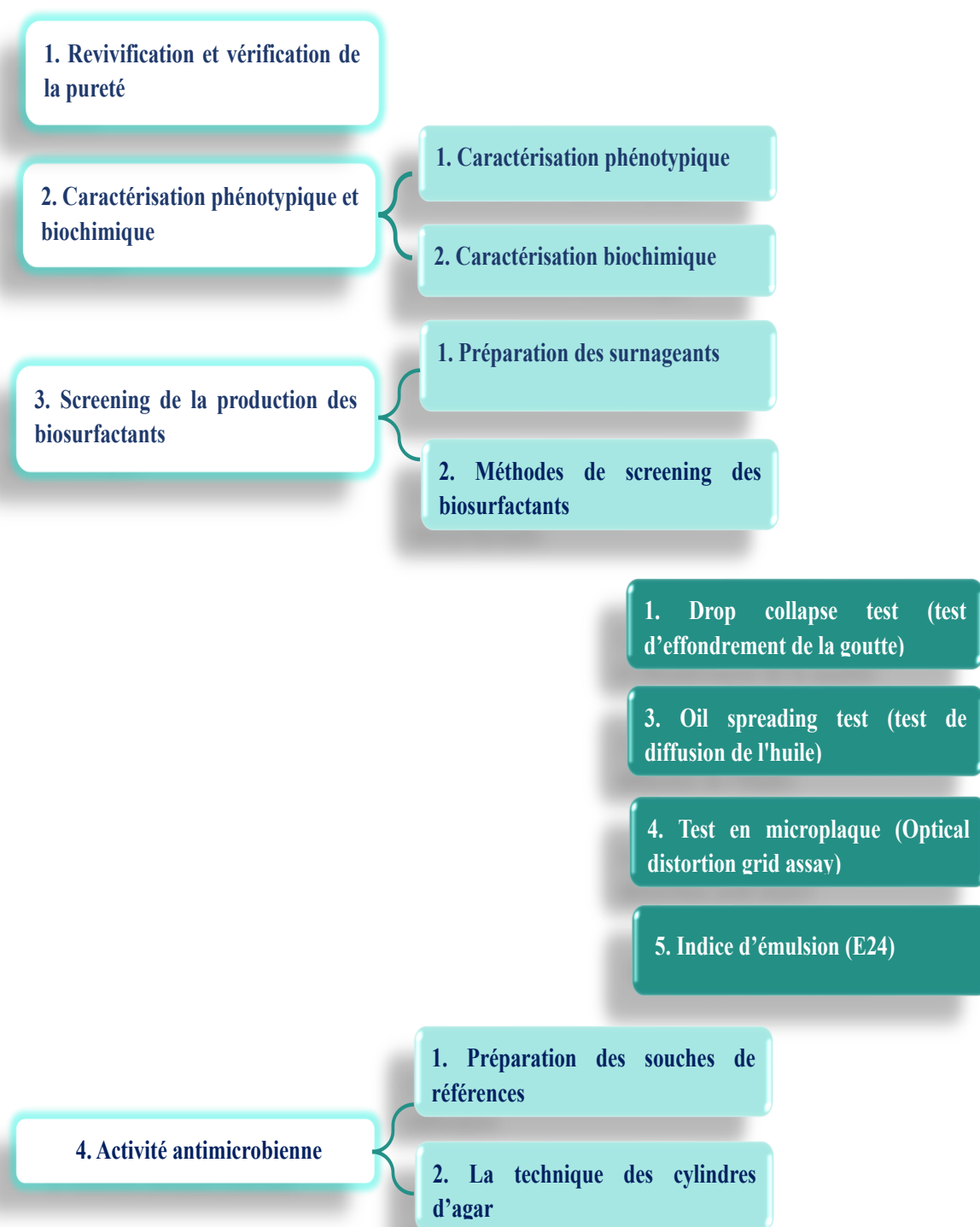


Figure 6: Protocole expérimental

2. Origine, revivification et vérification de la pureté des souches

L'isolat utilisé pour cette étude a été isolé en février 2014 et identifié par Dr. NAS Fatima à partir des échantillons d'eau prélevés d'un écosystème hypersalin « la Grande Sebkhah d'Oran ». Il porte le code : LMB3060. Il est affilié au genre *Halomonas* après le séquençage du gène codant de l'ARN 16S (Saïbi et *al.*, 2022).

Sa conservation a été effectuée à -20°C sur Bouillon Nutritif à 10% de NaCl (p/v) additionné de 25 % de glycérol (v/v). A partir des cultures conservées, 200 µL ont été inoculés dans 5 mL de Bouillon Nutritif additionné de 10 % de NaCl (p/v). La culture a ensuite été incubée à 37°C jusqu'à l'apparition d'un trouble. Des repiquages ont été effectués par la suite sur Gélose Nutritive à 10% de NaCl (p/v) afin de vérifier la pureté de l'isolat. Des observations microscopiques après coloration de Gram ont été réalisées dans le but de vérifier la morphologie cellulaire et le type de Gram. Les isolats ont été conservés à nouveau à 4°C sur Gélose Nutritive inclinée supplémentée de 10 % de NaCl (p/v), et à -20°C sur Bouillon Nutritif contenant 10% de NaCl (p/v) et 25% (v/v) de glycérol.

3. Caractérisation phénotypique et biochimique

3.1. Caractérisation phénotypique

L'isolat LMB3060 a fait l'objet d'une caractérisation phénotypique selon le protocole proposé par Logan et *al.* (2009) pour la description de nouveaux taxons.

Détermination des caractères macroscopiques et microscopiques Les caractères macroscopiques (taille, pigmentation, forme, opacité, élévation et consistance des colonies) et microscopiques (morphologie et mode de regroupement, mobilité et Gram) de l'isolat a été déterminés à partir de cultures de 48 et sur GN supplémentée d'une concentration de 10% de NaCl (p/v).

L'examen microscopique a été effectué en réalisant :

- Un état frais : Il permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie, de leur mode de regroupement et de leur mobilité éventuelle (Girard et Rougieux, 1967). L'examen des bactéries à l'état frais se fait entre lame et lamelle observé au grossissement x 40.

- Une coloration différentielle, pour mettre en évidence les propriétés structurales de la paroi bactérienne. Et classer les bactéries en deux groupes distincts : bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif. La coloration a été réalisée selon le protocole décrit par Gram en 1884, puis les observations à immersion (x100).

3.2. Caractérisation biochimique

3.2.1. Système API® 20E

Les galeries API® 20E permettent d'étudier 20 tests biochimiques. Dans notre étude, seulement les 12 premiers tests ont été considérés. Ils comportent la recherche de la β Galactosidase (ONPG), l'Ornithine décarboxylase (ODC), la lysine décarboxylase (LDC), l'arginine dihydrolase (ADH), l'utilisation du citrate (CIT), la production du H₂S, d'uréase (URE), du tryptophane désaminase (TDA), d'indole (IND), d'acétoïne (VP) et la liquéfaction de la gélatine (GEL). Le microtube GLU étant inoculé pour la révélation de la Nitrate réductase. La manipulation a été réalisée suivant les instructions du fabricant. La préparation de l'inoculum se fait dans les ampoules d'API® NaCl 0,85 % Medium à partir des cultures de 24 heures. L'opacité de la suspension est ajustée à 0.5 McFarland (DO_{600nm} = 0.1). Après incubation, 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 galerie.

3.2.2. Mise en évidence 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 (Health Protection Agency, 2011).

3.2.3. Mise en évidence de la cytochrome-oxydase

Le test d'oxydase consiste à rechercher la 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- test sur un disque imprégné du réactif oxalate de N-diméthyl paraphénylène-diamine. La présence de l'enzyme se traduit par un virage de la couleur vers un violet noirâtre (Public Health England, 2014).

4. Screening de la production des biosurfactants

4.1. Préparation des surnageants

A partir des cultures pures de 24 heures, 100 mL de Bouillon Nutritif à 10% de NaCl ont été inoculés. Après 5 jours d'incubation à 37°C sous agitation à 180 rpm, chaque suspension a été centrifugée à 10000 t/min à 4°C pendant 30 minutes, et les différents surnageants ont été récupérés.

4.2. Méthodes de screening des biosurfactants

4.2.1. Test d'effondrement de la goutte (Drop collapse test)

Ce test a été réalisé selon la méthode de Mohanram et *al.* (2016), 20 microlitres d'huile d'olive ont été déposés sur une lame microscopique, puis celle-ci a été laissée en équilibre pendant 2 heures. Par la suite, 10 µL de surnageant ont été ajoutés à la surface de l'huile et laissés au repos pendant 2 à 3 minutes. La présence de biosurfactants dans le surnageant se manifeste par l'effondrement de la goutte, tandis qu'un résultat négatif est caractérisé par une goutte conservant sa forme arrondie. Une solution de SDS à 10 % et de l'eau distillée ont été utilisées respectivement comme contrôle positif et négatif.

4.2.2. Test de diffusion de l'huile (Oil spreading test)

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par Youssef et *al.* (2004). Une boîte de Pétri a été remplie avec 20 mL d'eau distillée, puis 20 µL d'huile y ont été ajoutés. Ensuite, 10 µL de surnageant de culture ont été déposés à la surface de l'huile. La présence de biosurfactants

dans le surnageant se traduit par un déplacement de l'huile en formant une zone de clarification. Une solution de SDS à 10 % et de l'eau distillée ont été utilisées respectivement comme témoin positif et négatif.

4.2.3. Test en microplaque (Optical distortion grid assay)

L'activité de surface de chaque souche peut être évaluée qualitativement à l'aide du test en microplaque, mis au point et breveté par Cottingham et *al.* (2004). Ce test repose sur la modification de la distorsion optique induite par les tensioactifs dans une solution aqueuse. En l'absence de tensioactifs, l'eau pure déposée dans un puits hydrophobe conserve une surface plane. En revanche, la présence de tensioactifs entraîne un effet de mouillage sur les bords du puits, conférant à la surface du liquide une forme concave semblable à une lentille divergente. Pour réaliser ce test, 100 µL du surnageant ont été déposés dans les puits d'une microplaque à 96 puits. L'observation est effectuée en plaçant une feuille quadrillée sous la plaque. En présence de biosurfactant, la déformation concave de la surface du liquide provoque une distorsion de l'image de la grille située en dessous.

4.2.4. Indice d'émulsion (E24)

L'indice d'émulsion a été déterminé selon le protocole de Andreolli et *al.* (2023), il permet de vérifier la capacité des isolats à émulsionner une phase hydrophobe (huile) dans une phase hydrophile (le milieu de culture). Le test consiste à mélanger 2 mL de surnageant de culture avec 2 mL d'huile. Deux substrats ont été utilisés pour ce test : L'huile de table et l'huile d'olive . Les deux phases (huile / surnageant de culture) ont été vortexées pendant 5 minutes puis laissées reposer pendant 24h. Le calcul de l'E24 a été effectué selon la formule suivante : $E24 = (he / ht) \times 100$.

Où *he* : hauteur de l'émulsion.

ht : hauteur totale du mélange.

5. Activité antimicrobienne

5.1. Préparation des souches de références

L'évaluation du pouvoir antimicrobien des isolats a été effectuée vis-à-vis dix germes de référence (**Tableau 1**). L'ensemble de ces germes test est fourni par le laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-Alimentaire, au Biomédical et à l'Environnement LAMAABE - Université de Tlemcen.

Tableau 1 : Germes test de référence utilisés

Microorganismes	code
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC11778
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Staphylococcus aureus (MSSA)</i>	ATCC 25923
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 15307
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 70603

5.2. Standardisation des inocula des germes test

Les suspensions microbiennes des germes test ont été standardisées conformément aux recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Pour les bactéries, les suspensions mères ont été préparées dans de l'eau physiologique stérilisée, à partir des cultures de 24 heures à 37 °C sur gélose Müller-Hinton. La densité optique de chaque suspension a été ajustée entre 0,08 et 0,1 à la longueur d'onde $\lambda = 600$ nm (l'équivalent de 0.5 McFarland standard ou de 1×10^8 à 2×10^8 UFC m.l-1) CLSI M02-A12 (2015).

5.3. La technique des cylindres d'agar

Les activités antimicrobiennes des isolats ont été évaluées par la technique des cylindres d'agar (**Balouiri et al., 2016**). Cette technique consiste à ensemencer l'isolat LMB3060 sur milieu gélosé de façon à obtenir un tapis. Après incubation, des cylindres d'agar seront prélevés et déposés sur des boîtes de Pétri contenant des milieux gélosés préalablement ensemencés par les suspensions des microorganismes test.

A partir d'une culture de 24 à 48 heures à 37°C de l'isolat LMB3060 sur Bouillon Nutritif à une concentration de NaCl (10%), des suspensions de densité optique de 0,1 à la longueur d'onde $\lambda = 600$ nm ont été préparées. Un volume de 100 μ l de chaque suspension a été étalé par râteau sur des boîtes Pétri contenant une GN additionnées de 10% de NaCl. Après 5 jours d'incubation à 30°C, les cultures ont été raclées et des cylindres d'agar d'environ de 6 mm de diamètre ont été prélevés et déposés sur des boîtes de Pétri contenant du :

- Müller-Hinton préalablement ensemencé par écouvillonnage de suspensions de souches de référence ;
- Des cylindres d'agar prélevés à partir des géloses nutritives à 10% de NaCl (p/v) non ensemencées ont servi comme témoins.

Les boîtes de Pétri ont été laissées par la suite à 4 °C pendant deux heures afin de permettre une bonne diffusion des substances antimicrobiennes, puis incubées à 37°C. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés après 24 heures.

Résultats et Discussion

1. Résultats

1.1. Caractérisation phénotypique et biochimique

I.1.1. Observation microscopique et macroscopique de l'isolats LMB3060

Les caractères microscopiques et macroscopiques de l'isolat ont été déterminés après 24 heures d'incubation à 37°C sur Gélose Nutritive à 10% de NaCl (p/v).

Les colonies de l'isolats forment des colonies circulaires à bords irréguliers, translucides, à surface lisse, semi-bombée, de couleur blanchâtre avec un diamètre de 3 mm. **Fig. 7.**

L'observation des cellules fixées des isolats, après coloration de Gram a été effectuée à objectif 100 à immersion, elle a montré que les cellules possèdent la forme bâtonnet, elles se disposent souvent en paires ou en chaînettes avec un type de paroi à Gram négatif (**Fig.8**). L'examen des bactéries à l'état frais se fait entre lame et lamelle observé au grossissement x 40, montre que les cellules de l'isolat LMB3060 sont mobiles.

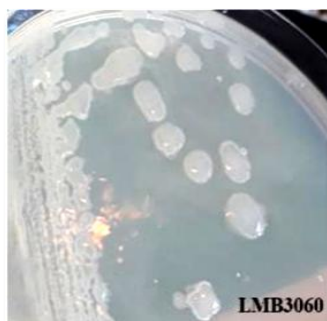


Figure 7 : Résultat de l'aspect macroscopique des colonies de l'isolat LMB3060 après 24hr d'incubation à 37°C sur gélose nutritive à 10% de NaCL (p/v).

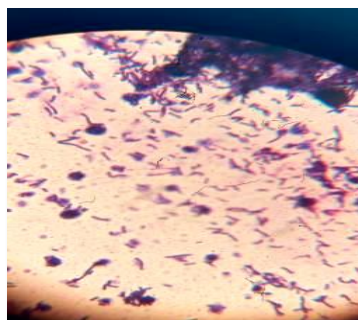


Figure 8 : observation microscopique (grossissement x100 à immersion) des cellules fixées de l'isolat LMB3060 après coloration de Gram après 24hr d'incubation à 37°C sur gélose nutritive à 10% de NaCL (p/v).

I.1.2 Caractérisation biochimique

Les propriétés métaboliques et le profil biochimique des isolats ont été caractérisés en utilisant les systèmes API® 20E couplés aux techniques de la microbiologie classique : la recherche de la catalase et la cytochrome oxydase.

La recherche des enzymes respiratoires a révélé que l'isolat lmb3060 possédait la catalase et la cytochrome oxydase.

Pour le système API® 20E, seulement les 12 premiers tests ont été pris en considération. Les résultats de la galerie API® 20E ont montré que l'isolats utilisaient le glucose (GLU, pouvaient dégrader la gélatine. La tryptophane désaminase (TDA) était absente, l'isolat était incapable de produire le H₂S et de dégrader le tryptophane en indole. La réaction de Voges Proskauer (VP), qui met en évidence la production de butandiol et l'acétoïne, était positive. L'isolat réduisait les nitrates en nitrites. L'ornithine décarboxylase (ODC) était absent. L'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie s'est révélée positive. Les différents caractères biochimiques étudiés par les systèmes API® 20E sont représentés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2: profil biochimique partiel de l'isolat LMB3060 obtenu par la galerie API® 20E.

Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	Citrate	H ₂ S	Urease	TDA	Indole	VP
					Simmons					
Résultat	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+

1.2. Résultats du screening de l'activité biosurfactant

1.2.1. Drop collapse test (test d'effondrement de la goutte)

Les résultats du test de drop collapse sont illustrés dans la figure 9. Ce test est jugé positif lorsque l'ajout d'un surnageant de culture à une goutte d'huile entraîne une extension du diamètre de la goutte supérieure à 1 mm, comparativement au témoin négatif qui est l'eau distillée. L'augmentation du diamètre observé est relative à la quantité de biosurfactant contenue dans le surnageant. Les résultats obtenus révèlent que la souche étudiée n'a présenté aucune activité positive à ce test.

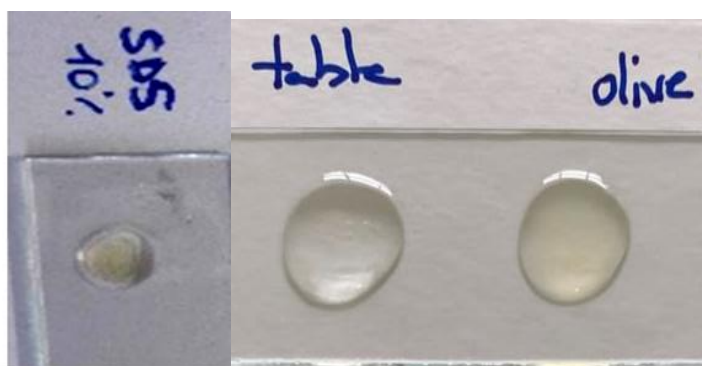


Figure 9 : résultats du drop collapse test des isolats et contrôle positif (SDS10%).

1.2.2. Oil spreading test (test de diffusion de l'huile)

Le test oil spreading est considéré comme positif, lorsqu'il y a une dispersion de la plage d'huile à la surface d'eau après l'ajout du surnageant bactérien contenant le biosurfactant. Les résultats obtenus montrent que l'isolats était négative.

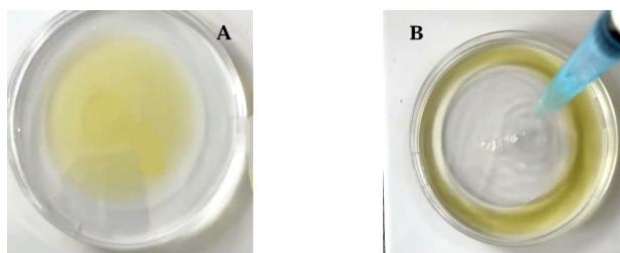


Figure 10 : résultats du oil spreading test : **A.** oil spreading obtenu avec le surnageant de l'isolat LMB3060 et **B.** oil spreading obtenu avec le SDS (témoin positif).

1.2.3. Test de microplaque (Optical distortion grid assay)

La figure 11 présente les résultats obtenus lors de l'évaluation de la production de biosurfactants par la méthode de microplaque. Le surnageant issu de l'isolat n'as pas donné des résultats positifs, caractérisés par une apparence concave et une image de grille déformée. Le témoin négatif (eau distillée) a montré une surface non déformée. Le témoin positif (le SDS 10%) est considéré comme un témoin positif.

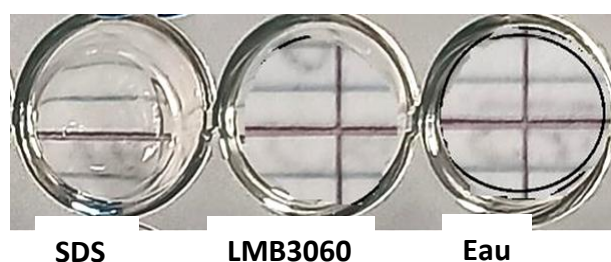


Figure 11 : résultats obtenus par le test de microplaque

1.2.4. Indice d'émulsion (E24)

Ce test a été réalisé en utilisant l'huile d'olive comme substrat. Un résultat positif se manifeste par la formation d'une émulsion stable entre les phases aqueuse et huileuse, caractérisée par l'apparition d'une mousse (Figure 12) qui doit se stabiliser pendant au moins 24 heures avant d'être soumise à la mesure.

Les résultats de l'indice d'émulsion E24 sont présentés dans la figure. Ils indiquent que le surnageant testé n'a pas présenté un indice d'émulsion.

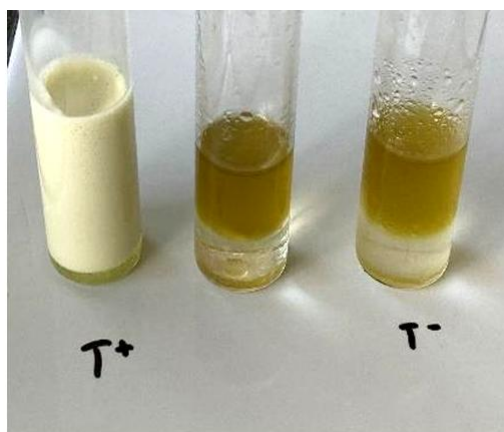


Figure 12 : évaluation de l'indice d'émulsion (E24) du surnageant de l'isolat LMB3060

1.3. Résultats du Screening de l'activité antimicrobienne

Les activités antibactériennes de l'isolat LMB3060 ont été testées vis-à-vis différents germes de référence. L'isolat a été cultivé sur Gélose Nutritive additionnée par 10% NaCl (p/v) à 37° pendant cinq jours puis testés contre des bactéries par la technique des cylindres d'agar. L'isolat étudié a présenté une activité antimicrobienne positive contre *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de 5 mm. La figure 13 présente des photos des résultats de l'activité antimicrobienne de l'isolat vis-à-vis différents germes de références.

Tableau 3: activité antimicrobienne de l'isolat LMB3060 vis-à-vis de différents germes de référence par la technique des cylindres d'agar.

Microorganismes	Code ATCC	Diamètre de zone d'inhibition (mm)
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC11778	-
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	5
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	-
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 15307	Éliminé (contamination)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 70603	-

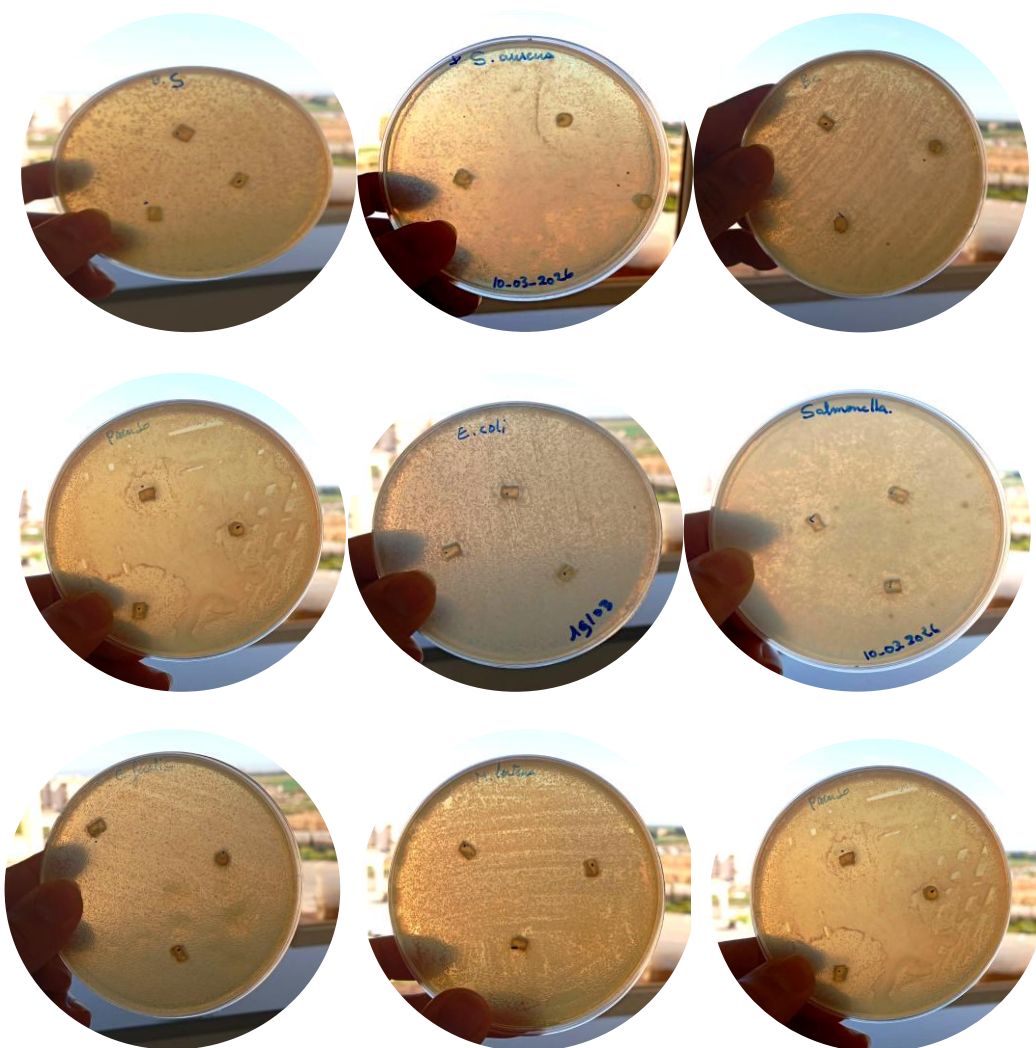


Figure 13: résultats de l'activité antimicrobienne de l'isolat LMB3060 avec les différents germes testés.

2. Discussion :

Cette recherche vise principalement à examiner les aptitudes biologiques d'isolats extrêmement ophiles associés au genre *Halomonas*, issus de l'écosystème hypersalins de la Grande Sebkhah d'Oran. Cette souche, a fait l'objet d'une étude approfondie visant à caractériser ses aspects phénotypiques et biochimiques, sa production de biosurfactants ainsi que son potentiel antimicrobien.

Caractéristiques Phénotypiques

L'examen microscopique de l'isolat a révélé des cellules de forme bacillaire (bâtonnets), mobiles, et présentant une coloration de Gram négative. Cette morphologie est caractéristique du genre *Halomonas*, dont les espèces sont classiquement décrites comme des bacilles aérobies mobiles, généralement pourvus d'un flagelle polaire ou péritriche (Ventosa, Arahal, et Mellado, 2022). La mobilité constitue un critère phénotypique distinctif au sein de la famille des *Halomonadaceae*, permettant notamment de différencier certaines espèces étroitement apparentées mais immobiles (Mata, Llamas, et Béjar, 2021). Des études récentes confirment que la majorité des souches environnementales d'*Halomonas* isolées de milieux hypersalins conservent cette propriété de mobilité, essentielle à la chimiotaxie et à la colonisation de niches écologiques hétérogènes (Zhou et al., 2023).

La coloration de Gram négative observée se traduit par une coloration rose après la contre-coloration, indiquant l'absence de couche épaisse de peptidoglycane et la présence d'une membrane externe caractéristique des bactéries à Gram négatif (Mora, Ramírez, et López, 2022). Cette structure membranaire est bien documentée chez le genre *Halomonas*, dont les représentants possèdent une paroi cellulaire typique des Protéobactéries (classe Gammaproteobacteria) (Ventosa et al., 2022). La paroi cellulaire des *Halomonas* contient généralement de l'acide diaminopimélique (DAP) comme acide aminé caractéristique du peptidoglycane, ce qui est cohérent avec la réponse négative à la coloration de Gram (Mata et al., 2021).

Le profil biochimique

L'isolat s'est révélé positif pour les deux tests enzymatiques : catalase et oxydase. La présence de l'enzyme catalase, qui décompose le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène moléculaire, est un caractère constant chez les *Halomonas* adaptées à des environnements oxygénés ou microaérophiles (Kumar, Singh, et Mishra, 2023). Cette enzyme protège la cellule contre le stress oxydatif généré par la respiration aérobie, particulièrement important dans les milieux hypersalins où la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est accrue (Zhou et *al.*, 2023).

La positivité de l'oxydase (cytochrome c oxydase) indique la présence d'une chaîne respiratoire fonctionnelle avec un système de cytochromes de type **c**, caractéristique des *Gammaproteobacteria* aérobies (Ventosa et *al.*, 2022). Ce résultat est attendu pour le genre *Halomonas*, bien que certaines espèces isolées de sédiments anoxiques puissent présenter une activité oxydase faible ou tardive (Mata et *al.*, 2021). La combinaison catalase positive / oxydase positive est un profil typique des *Halomonadaceae* et constitue un élément clé de leur identification phénotypique préliminaire (Kumar et *al.*, 2023).

Le profil biochimique obtenu – catalase positive, oxydase positive, utilisation du citrate comme source de carbone unique, et réaction de Voges-Proskauer (VP) positive – est caractéristique du métabolisme robuste et aérobie des bactéries du genre *Halomonas* (Ventosa, Arahal, et Mellado, 2022). La positivité simultanée de la catalase et de l'oxydase confirme la présence d'une chaîne respiratoire fonctionnelle et d'une protection efficace contre le stress oxydatif, deux adaptations essentielles à la survie dans des environnements hypersalins où les fluctuations de salinité génèrent des espèces réactives de l'oxygène (Kumar, Singh, et Mishra, 2023). L'utilisation du citrate indique la capacité de l'isolat à métaboliser des acides tricarboxyliques via la voie glyoxylique, un trait métabolique partagé par de nombreuses *Halomonadaceae* adaptées à des environnements pauvres en sucres fermentescibles (Zhou et *al.*, 2023).

L'aptitude de LMB3060 à croître sur un milieu additionné de 10 % de NaCl confirme que cet isolat est un micro-organisme halotolérant modéré (ou halophile modéré), selon la classification classique des micro-organismes halophiles (Oren, 2021). Les *Halomonas* sont

typiquement des halophiles modérés, avec une croissance optimale entre 3 et 15 % de NaCl, mais certaines espèces peuvent tolérer jusqu'à 20-25 % (Ventosa et *al.*, 2022). Cette capacité de résilience osmotique constitue un avantage adaptatif majeur par rapport aux bactéries mésophiles standards comme *Escherichia coli*, qui ne tolère généralement pas des salinités supérieures à 3-5 % en milieu aérobie (Kumar et *al.*, 2023).

Screening des Biosurfactants

La mise en évidence de la production de biosurfactants par l'isolat LMB3060 a été réalisée par une combinaison de tests qualitatifs (drop collapse, oil spreading, microplaque) et quantitatifs (indice d'émulsion E24). Cette approche multidimensionnelle est méthodologiquement justifiée, car la réponse des souches peut varier considérablement selon la nature chimique des molécules produites (glycolipides, lipopeptides, phospholipides, ou polymères émulsifiants), leur charge ionique, leur poids moléculaire, et leur concentration (Bharali, Konwar, et Thakur, 2022). Aucun test unique ne permet à lui seul de détecter l'intégralité des biosurfactants connus, d'où la nécessité d'une batterie de tests complémentaires (Mohanty, Mukherji, et Suresh, 2023).

Les résultats obtenus ont montré une absence d'activité biosurfactante détectable dans toutes les méthodes utilisées. Ces résultats suggèrent deux interprétations non exclusives : soit une **absence totale de production** de biosurfactants par la souche LMB3060, soit une **production en quantité inférieure au seuil de détection** des méthodes employées, dans les conditions expérimentales adoptées (Gautam, Kaur, et Kaur, 2024).

- **Test de drop collapse**

Le test de drop collapse repose sur la capacité des biosurfactants à réduire la tension superficielle d'un liquide, entraînant l'étalement d'une goutte déposée sur une surface hydrophobe (par exemple, une couche d'huile ou une surface paraffinée). Dans notre étude, aucune extension significative de la goutte n'a été observée, indiquant une absence d'activité tensioactive du surnageant bactérien.

Des résultats similaires ont été rapportés par Das, Das, et Mazumder (2022), qui ont montré que certaines bactéries halotolérantes présentent des résultats négatifs au test de drop collapse lorsque la concentration en biosurfactants est inférieure à la concentration micellaire critique (CMC) ou lorsque les molécules produites sont de nature polymérique (émulsifiants à haut poids moléculaire) plutôt que tensioactifs à faible poids moléculaire. Le test de drop collapse est en effet plus sensible aux glycolipides de faible CMC (ex : rhamnolipides, sophorolipides) qu'aux lipopeptides ou aux polymères bioémulsifiants (Mohanty et *al.*, 2023).

- **Test oil spreading**

Les résultats négatifs obtenus lors du test oil spreading confirment cette absence d'activité tensioactive. Ce test est considéré comme positif lorsqu'une zone claire (diamètre de dispersion) apparaît après déplacement de la couche d'huile à la surface de l'eau, indiquant une réduction de la tension interfaciale. L'absence de dispersion observée pourrait être liée à une faible concentration du biosurfactant dans le surnageant, mais aussi à la nature de l'huile utilisée (Sarkar, Pal, et Dey, 2023). Selon Joyce, Pandian, et Deepak (2024), la production de biosurfactants dépend fortement de plusieurs facteurs environnementaux, notamment : La source de carbone (hydrophile vs hydrophobe), la salinité du milieu, le pH initial, la température d'incubation, l'aération (agitation, rapport volume/flacon) et la composition en azote et en minéraux. Ces auteurs ont également montré que certaines bactéries ne produisent des biosurfactants qu'en présence de **substrats hydrophobes inducteurs**, tels que les hydrocarbures (ex : hexadécane, kérosène, pétrole brut) ou certaines huiles végétales (huile d'olive, huile de tournesol). L'utilisation d'un milieu riche en glucose ou en substrat hydrophile (fréquemment utilisé pour la croissance des *Halomonas*) peut réprimer la biosynthèse des biosurfactants, même chez des souches potentiellement productrices (Gautam et *al.*, 2024).

- **Test de microplaque (Optical distortion grid assay)**

Le test de microplaque n'a montré aucune déformation de la grille observée sous les puits contenant le surnageant de l'isolat LMB3060. Cette absence de déformation traduit une

incapacité du surnageant à modifier la tension superficielle du liquide (mesure indirecte de l'activité tensioactive). Les résultats obtenus concordent avec ceux des tests précédents.

Ce test, bien que rapide et économique, souffre d'une sensibilité limitée pour les biosurfactants produits à faible concentration ou pour ceux qui réduisent modérément la tension superficielle (par exemple, une réduction de 72 à 45 mN/m peut être insuffisante pour déformer visiblement la grille) (Mohanty et *al.*, 2023). Singh, Singh, et Srivastava (2022) ont souligné que les méthodes qualitatives rapides de détection des biosurfactants peuvent parfois manquer de sensibilité lorsque les concentrations produites sont inférieures à 1 g/L ou lorsque les molécules sont fortement liées aux cellules (biosurfactants liés à la membrane).

• Indice d'émulsion E24

Concernant l'indice d'émulsion E24 (capacité à stabiliser une émulsion huile-dans-eau après 24 heures), aucun pouvoir émulsifiant n'a été observé avec l'huile d'olive utilisée comme substrat. L'absence d'émulsion stable après 24 heures indique que l'isolat étudié ne produit pas de composés capables de stabiliser l'interface entre les phases aqueuse et huileuse.

Plusieurs études récentes ont montré que l'activité émulsifiante varie considérablement selon trois facteurs principaux (Bharali et *al.*, 2022 ; Sarkar et *al.*, 2023) :

- **La nature de l'huile utilisée** (huile d'olive, huile de soja, hexadécane, cyclohexane, toluène)
 - un biosurfactant peut émulsionner une huile aliphatique mais pas une huile aromatique, et vice versa.
- **La structure chimique du biosurfactant produit** – les polymères bioémulsifiants (ex : émulsane, alasan) sont de meilleurs émulsifiants que les tensioactifs à faible poids moléculaire (ex : rhamnolipides).
- **La concentration en biosurfactant** – un seuil minimal (souvent > 0,5 g/L) est nécessaire pour obtenir une émulsion stable.

De plus, certains biosurfactants possèdent une forte capacité de réduction de la tension superficielle (jusqu'à 30 mN/m) mais un faible pouvoir émulsifiant (E24 < 20 %), ce phénomène

étant bien documenté pour certains lipopeptides (Gautam et *al.*, 2024). L'absence d'émulsification ne signifie donc pas nécessairement l'absence de réduction de la tension superficielle.

La littérature scientifique a clairement démontré que la production de biosurfactants est **hautement inductible et dépendante des conditions de culture**. Chez les bactéries halophiles, plusieurs études ont rapporté une production conditionnelle. Kebbouche-Gana, Gana, et Khemili (2021) ont montré que certaines bactéries halophiles du genre *Halomonas* et d'autres *Gammaproteobacteria* isolées de sebkhas produisent des biosurfactants uniquement dans des milieux riches en hydrocarbures (ex : hexadécane, pétrole brut) et à des concentrations élevées en NaCl (10-15 %), avec un pH légèrement alcalin (pH 8-9). Dans un milieu standard riche en glucose et en extrait de levure (type milieu Luria-Bertani modifié salé), ces mêmes souches ne montrent aucune activité biosurfactante détectable (Gautam et *al.*, 2024).

Chez le genre *Halomonas* spécifiquement, certaines espèces (*H. elongata*, *H. eurihalina*, *H. salina*, *H. alkaliphila*) ont été décrites comme productrices de biosurfactants, mais presque exclusivement en présence d'une source de carbone hydrophobe (ex : hexadécane, kérosène, huiles) et dans des conditions de **limitation en azote** (rapport C/N élevé) (Joyce et *al.*, 2024 ; Zhao, Li, et Chen, 2024).

Ainsi, l'absence d'activité biosurfactante observée chez l'isolat LMB3060 pourrait être liée aux conditions expérimentales utilisées plutôt qu'à une incapacité totale de production. Les conditions testées (probablement milieu riche en glucose ou en substrat hydrophile, en aérobiose standard) n'étaient peut-être pas permissives pour l'expression des gènes de la biosynthèse des biosurfactants.

L'Activité Antimicrobienne

Les résultats obtenus ont montré que l'isolat LMB3060 possède une activité antimicrobienne **uniquement contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**, avec une zone d'inhibition mesurée à **5 mm de diamètre**. Aucune activité n'a été observée contre les autres bactéries testées, incluant les bacilles Gram positifs (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria*

monocytogenes), les coques Gram positifs (*Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*), ainsi que l'ensemble des bactéries Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*).

Cette activité, bien que modeste, indique que l'isolat est capable de produire des substances antimicrobiennes actives contre certaines bactéries, avec un spectre d'action restreint et sélectif.

La sensibilité observée uniquement chez *Staphylococcus aureus* (et non chez les cinq autres bactéries Gram positif testées) est **inattendue** et mérite une analyse approfondie. En règle générale, les bactéries Gram positif sont considérées comme plus sensibles aux substances antimicrobiennes que les bactéries Gram négatif, en raison de l'absence de membrane externe protectrice chez les premières (Madigan, Bender, Buckley, Sattley, et Stahl, 2021). Cependant, cette sensibilité n'est pas uniforme au sein des Gram positifs, comme le montrent nos résultats.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la sensibilité spécifique de *S. aureus* ATCC 25923

Hypothèse 1 : Une cible métabolique spécifique à S. aureus

Le composé antimicrobien produit par LMB3060 pourrait cibler une voie métabolique ou une structure particulière présente uniquement chez *S. aureus*. Par exemple, certaines bactériocines (pédiocines, salivaricines) ou peptides antimicrobiens montrent une spécificité d'espèce très étroite, agissant contre *S. aureus* sans affecter d'autres Gram positifs comme *Bacillus* ou *Enterococcus* (Cotter, Ross, et Hill, 2022). Des études récentes ont montré que certaines souches halophiles produisent des composés de type nisine ou des lantibiotiques spécifiquement actifs contre *S. aureus*, notamment *methicillin-sensitive S. aureus* (MSSA) (Zhao, Li, et Chen, 2024).

Hypothèse 2 : Variation de la perméabilité membranaire

La membrane cytoplasmique des différentes bactéries Gram positif présente des variations dans sa composition en acides gras, en phospholipides et en acides teichoïques, ce qui peut moduler la sensibilité aux agents antimicrobiens (Miller, 2021). *S. aureus* possède une membrane relativement plus fluide et perméable que *Bacillus subtilis* ou *Enterococcus faecalis*,

ce qui pourrait faciliter l'entrée de certains composés (Kumar, Singh, et Mishra, 2023). À l'inverse, *Micrococcus luteus* est connu pour sa paroi cellulaire particulièrement épaisse et sa résistance naturelle à certains antibiotiques (Madigan et *al.*, 2021).

Hypothèse 3 : Production d'enzymes de dégradation par certaines cibles

Certaines bactéries Gram positif (notamment *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*) produisent naturellement des enzymes de dégradation des peptides (protéases, peptidases) capables d'inactiver des composés antimicrobiens de nature peptidique (Cotter et *al.*, 2022). Si le composé antimicrobien produit par LMB3060 est de nature peptidique (bactériocine, lipopeptide), il pourrait être dégradé par les protéases sécrétées par *Bacillus* spp., mais pas par celles de *S. aureus*, expliquant ainsi la spécificité observée (Kumar et *al.*, 2023).

L'absence totale d'activité contre les trois bactéries Gram négatif testées (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) est cohérente avec la littérature scientifique. Les bactéries Gram négatif possèdent une **membrane externe** composée de lipopolysaccharides (LPS) qui constitue une barrière de perméabilité efficace contre de nombreux composés hydrophobes et de haut poids moléculaire (Miller, 2021). Seules certaines classes d'antimicrobiens (comme les polymyxines, certains peptides cycliques, ou des composés chélateurs) peuvent traverser cette barrière (Madigan et *al.*, 2021).

Des résultats similaires ont été rapportés par Sharma, Singh, et Kapoor (2022), qui ont montré que plusieurs bactéries halophiles isolées de environnements salins présentent une activité antimicrobienne sélective contre les bactéries Gram positif sans affecter les Gram négatif. De même, Kebbouche-Gana, Gana, et Khemili (2021) ont observé que des souches d'*Halomonas* isolées de sebkhas algériennes produisaient des composés actifs uniquement contre *S. aureus* et *Listeria monocytogenes* (mais pas contre *Bacillus* ou *E. coli*). Le faible diamètre de la zone d'inhibition observé (5 mm) peut être interprété de plusieurs manières non exclusives :

Production en faible quantité ou diffusion limitée

Selon les critères standards du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), une zone d'inhibition inférieure à 10-12 mm est généralement considérée comme une **activité faible** ou une **sensibilité intermédiaire** (CLSI, 2023). Cela pourrait indiquer une production de composés antimicrobiens en quantité limitée dans les conditions de culture utilisées, ou une diffusion restreinte des molécules dans le milieu gélosé (Balouiri, Sadiki, et Ibnsouda, 2021).

Facteurs influençant la production

La production de composés antimicrobiens par les bactéries est hautement dépendante des conditions de culture. Plusieurs études ont montré que la production maximale est souvent atteinte à des phases de croissance spécifiques (généralement en fin de phase exponentielle ou en début de phase stationnaire) et nécessite des conditions environnementales précises (pH, température, salinité, aération, composition du milieu) (Balouiri et *al.*, 2021 ; Cotter et *al.*, 2022).

Méthode de détection

La méthode de diffusion sur disque (ou sur puits) utilisée peut manquer de sensibilité pour des composés produits à faible concentration ou pour des molécules de haut poids moléculaire diffusant mal dans l'agar (Miller, 2021). Des méthodes alternatives (microdilution en bouillon, contact direct en surface, coculture) pourraient révéler une activité plus importante (Sharma et *al.*, 2022).

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives

L'étude de l'isolat LMB3060 est la preuve de la richesse biotechnologique des milieux hypersalins algériens. Cette étude dépasse la simple analyse descriptive afin de mettre en évidence la plasticité métabolique des *Halomonas* halophiles, dont l'exploitation raisonnée pourrait apporter des solutions aux défis actuels de la chimie verte et de la pharmacologie environnementale.

L'ensemble des résultats obtenus converge vers une identification robuste au genre *Halomonas*, tout en révélant un potentiel biotechnologique contrasté selon les activités recherchées. Sur le plan taxonomique et phénotypique, l'isolat LMB3060 présente l'ensemble des caractères distinctifs du genre *Halomonas* : bâtonnets mobiles, Gram négatif, catalase positive, oxydase positive, halotolérance modérée avec une croissance observée jusqu'à 10 % de NaCl, utilisation du citrate comme source de carbone unique, production d'acétoïne (VP+), et activité gélatinase positive. Ce profil métabolique, caractéristique des *Halomonadaceae*, confirme l'adaptation de cette souche aux conditions de forte pression osmotique typiques des sebkhas et autres milieux hypersalins.

Concernant la production de biosurfactants, les résultats obtenus sont négatifs pour l'ensemble des tests qualitatifs et quantitatifs réalisés, à savoir le test de drop collapse, le test oil spreading, le test de microplaque, ainsi que l'indice d'émulsion E24. Aucune réduction de la tension superficielle ni aucun pouvoir émulsifiant n'ont été détectés dans les conditions expérimentales adoptées. Cette absence d'activité détectable ne permet pas de conclure définitivement à une incapacité de production de biosurfactants par la souche LMB3060. Elle suggère plutôt que les conditions de culture utilisées – probablement un milieu riche en substrat hydrophile tel que le glucose, une aération standard, et une salinité peut-être non optimale – n'étaient pas permissives pour l'expression des gènes de biosynthèse des biosurfactants.

Sur le plan de l'activité antimicrobienne, l'isolat LMB3060 a montré une activité faible mais spécifique contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, avec une zone d'inhibition mesurée à 5 mm de diamètre. Aucune activité n'a été observée contre les autres bactéries testées. Cette spécificité étroite est à la fois surprenante et particulièrement intéressante. Elle suggère que le composé antimicrobien produit par

LMB3060 – potentiellement une bactériocine de type lantibiotique, un petit peptide cyclique, ou un lipopeptide – cible une structure ou une voie métabolique propre à *S. aureus*.

Ce travail présente plusieurs forces, notamment les tests de screening des biosurfactants, l'évaluation de l'activité antimicrobienne sur une large gamme de microorganismes cibles (neuf souches de référence ATCC), ainsi qu'une caractérisation phénotypique détaillée. Toutefois, plusieurs limites doivent être soulignées. Par ailleurs, les conditions de production des biosurfactants et des composés antimicrobiens n'ont pas été optimisées : un seul milieu de culture, une seule salinité, une seule source de carbone et un seul temps d'incubation ont été testés. L'absence d'étape de concentration des surnageants avant les tests d'activité constitue également une limite importante.

À la lumière de ces résultats, plusieurs recommandations peuvent être formulées pour valoriser au mieux le potentiel de l'isolat LMB3060.

Pour la production d'antimicrobiens, il est recommandé d'optimiser les conditions de culture en testant différentes sources de carbone (glucose, glycérol, amidon), différentes salinités (de 5 à 15 % NaCl), différents pH (de 6 à 9) et différentes durées d'incubation (de 24 à 120 heures), la production maximale étant souvent atteinte en phase stationnaire tardive.

Pour la production de biosurfactants, il est essentiel de tester une source de carbone hydrophobe telle que l'hexadécane, l'huile d'olive, le kérosène ou le pétrole brut à une concentration de 1 à 2 % (volume/volume), l'induction par substrat hydrophobe étant un prérequis chez de nombreuses *Halomonas*.

Au-delà de ces recommandations immédiates, plusieurs perspectives de recherche plus ambitieuses peuvent être envisagées.

Sur le plan appliqué, un plan d'expériences afin de maximiser la production du composé antimicrobien actif contre *S. aureus*. Sur le plan thérapeutique, le composé antimicrobien actif contre *S. aureus* mérite une caractérisation approfondie incluant sa purification (par chromatographie d'échange d'ions et HPLC préparative), la détermination de sa structure chimique (par spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire), la détermination de sa concentration minimale inhibitrice et de

sa concentration minimale bactéricide, l'évaluation de sa cytotoxicité sur cellules eucaryotes.

Sur le plan environnemental, bien que l'absence de biosurfactants détectés dans les conditions testées puisse sembler décevante, elle n'exclut pas un potentiel de dégradation des hydrocarbures.

Références bibliographiques

Liste des Références Bibliographiques

Ait Bachir, A., et Asli, A. (2020). *Caractérisation physico-chimique et microbiologique des eaux et des sédiments de la Sebkhha de Ben Ziane (Relizane)*[Mémoire de Master, Université de Mostaganem (UMAB), Algérie].

Andreolli, M., Villanova, V., Zanzoni, S., D'Onofrio, M., Vallini, G., Secchi, N., & Lampis, S. (2023). Characterization of trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine strain *Rhodococcus* sp. SP1d and its potential for environmental applications. *Microbial Cell Factories*, 22(1), Article 128. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02128-9>

Antón, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodríguez-Valera, F., Amann, R., & Rosselló-Mora, R. (2002). *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(Pt 2), 485–491. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-485>

Atalah, J., Cáceres-Moreno, P., Espina, G., & Blamey, J. M. (2019). Thermophilic microorganisms and their enzymes for cyclic nucleotides degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(23-24), 9373-9381.

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2021). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 11(2), 131-143.

Belhaoudjeb, S., et Arar, A. (2018). *Caractérisation physico-chimique et biologique des sols de la Sebkhha (Cas de la région de Batna)* [Mémoire de Master, Université de Batna, Algérie].

Bertoldo, C., et Antranikian, G. (2002). Starch-processing enzymes from archaea and bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(2), 151-160.

Bharali, P., Konwar, B. K., & Thakur, D. (2022). Biosurfactants from extremophiles: A comprehensive review on screening, production and applications. *Bioresource Technology*, 345, 126522.

Références bibliographiques

- Birien, T. (2018). *Génétique et génomique des microorganismes piézophiles des sources hydrothermales océaniques profondes* [Thèse de doctorat, Université Bretagne Occidentale, France].
- Blatt, H., Middleton, G., et Murray, R.(1980). *Origin of Sedimentary Rocks*. Prentice-Hall,Inc.
- Borjian, F., Amoozegar, M. A., Siroosi, M., et Sánchez-Porro, C. (2016). Halophilic bacteria and archaea: A diverse community in the hypersaline Meyghan Lake,Iran.*Journal of Genetic Resources*,2(2),73–84.
- Bousbiaa,N.(2021).*Caractérisation etévaluation du potentiel biotechnologique des bactéries halophiles isolées de milieux extrêmes(Sebkha)*[Thèse de doctorat,Université Constantine/Annaba,Algérie].
- Brock,T.D.,&Freeze,H.(1969).*Thermus aquaticus* gen.n.and sp.n.,a nonsporeforming extreme thermophile.*Journal of Bacteriology*,98(1),289-297.
- Cabrera,M.A.,&Blamey,J.M.(2022).Polyhydroxyalkanoate Production by Extremophiles Isolated From Antarctic Ecosystems.*Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*,9,Article 752281.
- Carrillo,P.G.,Mardaraz,C.,Pitta-Alvarez,S.I.,&Giulietti,A.M.(1996).Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria.*World Journal of Microbiology&Biotechnology*,12(1),82–84.<https://doi.org/10.1007/BF00327807>
- Cayol,J.L.,Ollivier,B.,Alazard,D.,et al.(2011).*Les conditions de vie extrêmes sur la planète et exobiologie*.
- Chen,S.C.,&Jiang,C.Y.(2018).Application of halophilic microorganisms in the treatment of saline wastewater.In *Extremophiles:From Biology to Biotechnology*.CRC Press.
- Chen,X.Y.,&Jiang,X.(2018).Production of polyhydroxyalkanoates(PHAs)by halophilic archaea and bacteria.*Journal of Biotechnology*,265,49-58.

Références bibliographiques

Cisse,F.,&Moussa Inoua,O.(2023).*Etude de la diversité bactérienne thermophile de la source thermale de Guelma(Hammam Debagh)*[Mémoire de Master,Université de Guelma,Algérie].

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2023). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests* (14th ed.). CLSI document M02-M07. CLSI.

Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI).(2015).*Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts;Approved Guideline—Second Edition*(CLSI Document M44-A2).Clinical and Laboratory Standards Institute.

Colwell,R.R.,&Huq,A.(1994).*Vibrios in the environment*.Wiley.

Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2022). Bacteriocins and their role in bacterial antagonism. *Nature Reviews Microbiology*, 20(6), 345-359.

Cottingham,M.G.,Bain,C.D.,&Vaux,D.J.T.(2004).Rapid method for measurement of surface tension in multiwell plates.*Laboratory Investigation*,84(4),523–527.<https://doi.org/10.1038/labinvest.3700054>

Das, S., Das, S., & Mazumder, B. (2022). Screening methods for biosurfactant-producing bacteria: A critical review. *Journal of Microbiological Methods*, 198, 106492.

DasSarma,S.,&Arora,P.(2001).Halophiles.In *Encyclopedia of Life Sciences(ELS)*.John Wiley&Sons,Ltd.

DasSarma,S.,Coker,J.A.,&DasSarma,P.(2010).Archaeobacteria.In *Encyclopedia of Life Sciences(ELS)*.John Wiley&Sons,Ltd.

Dawson,K.S.,Strapoć,D.,Huizinga,B.,&Macalady,J.L.(2012).Quantitative fluorescence in situ hybridization(FISH)of microbial communities in extremely hypersaline environments.*Microbial Ecology*,63(3),599-607.

Desai,J.D.,&Banat,I.M.(1997).Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential.*Microbiology and Molecular Biology Reviews*,61(1),47-64.

Références bibliographiques

- Dumorné,K.,Córdova,A.S.,Astorga-Eló,M.,&Renganathan,P.(2017).Extremozimes:A Potential Source for Industrial Applications.*Journal of Microbiology and Biotechnology*,27(4),649-659.
- Edbeib,M.A.,Wahab,R.A.,&Huyop,F.(2016).Halophiles:Biological adaptation, and their role in decontamination of environmental pollutants.*World Journal of Microbiology and Biotechnology*,32(8),Article 135.
- Gautam, K., Kaur, P., & Kaur, S. (2024). Halophilic bacteria as emerging sources of biosurfactants: Current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 44(2), 215-233.
- Grégoire,P.,Fardeau,M.L.,et al.(2009).Les micro-organismes de l'extrême.*Biofutur*,2009(299),25-30.
- Health Protection Agency.(2011).Catalase Test(UK Standards for Microbiology Investigations,Clinical Microbiology Procedures No.8 Issue 2.2).
- Horikoshi,K.(2008).Extremophiles.In *Encyclopedia of Life Sciences(eLS)*.John Wiley&Sons,Ltd.
- Jorquera,M.A.,Graether,S.P.,&Maruyama,F.(2019).Editorial:Bioprospecting and Biotechnology of Extremophiles.*Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*,7,Article 204.
- Joyce, S., Pandian, S., & Deepak, V. (2024). Biosurfactants from halophilic bacteria: A review on production, characterization and environmental applications. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(5), 6789-6810.
- Kabaş,A.,&Akcan,N.(2024).Optimization of Poly-β-Hydroxybutyrate(PHB)Production by *Halomonas* sp.Isolated fromÇamaltıSaltern.*Trakya University Journal of Natural Sciences*,11(1),15-28.

Références bibliographiques

- Kaye, J.Z., & Baross, J.A. (2000). High-pressure resistance and thermo-adaptation at the deep-sea abyss. *Marine Biotechnology*, 2(5), 423-438.
- Kebbouche-Gana, S., Gana, M. L., & Khemili, S. (2021). Biosurfactant production by halophilic bacteria isolated from Algerian Sebkha. *Extremophiles*, 25(3), 289-304.
- Khallef, M., Benammar, A., & Boutaiba, S. (2018). Isolation and characterization of halophilic bacteria from Chott Ain Beida (Ouargla, Algeria). *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 10(2), 226-241.
- Kim, S.J., Le, T.H., & Roh, S.W. (2013). *Halomonas songnenensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saline and alkaline soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM)*, 63(11), 4055-4061.
- Kour, D., Rana, K.L., et al. (2019). Bioprospecting of drought-tolerant and halotolerant extremophiles for alleviating drought and salinity stresses in plants. *Journal of Applied Microbiology*, 126(4), 1007-1022.
- Kumar, S., Singh, P., & Mishra, S. (2023). Phenotypic and genotypic characterization of halophilic bacteria from solar salterns. *Extremophiles*, 27(1), 5.
- Llamas, I., Amjres, H., & Mata, J. A. (2021). Exopolysaccharides and bioactive metabolites from *Halomonas* species. *Marine Drugs*, 19(6), 328.
- Logan, N.A., Berge, O., Bishop, A.H., Busse, H.J., De Vos, P., Fritze, D., Heyndrickx, M., Kämpfer, P., Rabinovitch, L., Salkinoja-Salonen, M.S., Seldin, L., & Ventosa, A. (2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore forming bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(8), 2114–2121. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.013649-0>
- MacElroy, R.D. (1974). Extremophiles: A review of strategies for growth and survival in unusual environments. *Origins of Life*, 5(3-4), 487-496.

Références bibliographiques

- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021). *Brock biology of microorganisms* (16th ed.). Pearson Education.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2006). *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed.). Pearson Prentice Hall.
- Mahajan, R. T., & Balachandran, S. (2017). Halophilic bacteria as a source of novel enzymes. *International Journal of Recent Scientific Research*, 8(6), 17315-17323.
- Mata, J. A., Llamas, I., & Béjar, V. (2021). *Halomonas*: Taxonomy, phylogeny and physiology. In R. H. Vreeland (Ed.), *Halophilic microorganisms* (pp. 89-124). Springer.
- Mata, J. A., Martínez-Cánovas, J., Quesada, E., & Béjar, V. (2002). A phylogenetic and phenotypic study of the genus *Halomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM)*, 52(6), 2145-2155.
- Mezani, L., & Meziani, W. (2022). *Caractérisation des bactéries halotolérantes isolées à partir d'une Sebkhia au Nord Algérien*.
- Miller, S. I. (2021). Antibiotic resistance and the Gram-negative outer membrane. *Annual Review of Microbiology*, 75, 561-582.
- Mnif, S., Chamkha, M., & Sayadi, S. (2009). Isolation and characterization of a *Halomonas* sp. strain SY6 capable of degrading diesel oil in high-salinity conditions. *Bioresource Technology*, 100(19), 4327-4333.
- Mohanram, R., Jagtap, C., & Kumar, P. (2016). Isolation, screening, and characterization of surface-active agent-producing, oil-degrading marine bacteria of Mumbai Harbor. *Marine Pollution Bulletin*, 105(1), 183-191. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.040>
- Mohanty, S., Mukherji, S., & Suresh, S. (2023). Methods for screening and characterization of biosurfactants: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 220, 114876.
- Mora, P., Ramírez, E., & López, F. (2022). Modern approaches for the identification of Gram-negative halophilic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 195, 106452.

Références bibliographiques

- Muhammad,S.,Shah,A.S.,&Hamayun,M.(2009).Assessment of plant growth promoting bacterial diversity from the rhizosphere of *Helianthus annuus* L.*Journal of Agricultural and Biological Science*,4(2),27-33.
- Naughton,P.J.,Marchant,R.,Dobrev,R.,&Banat,I.M.(2019).Microbial biosurfactants from extreme environments.*Applied Microbiology and Biotechnology*,103(1),129-143.
- Oger,P.,&Cario,A.(2014).La vie sous pression:Les stratégies d'adaptation des microorganismes piézophiles.*médecine/sciences*,30(6-7),670-678.
- Oren, A. (2021). Classification of halophilic microorganisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(8), 004876.
- Parte,A.C.(2014).LPSN—List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.*Nucleic Acids Research*,42(D1),D613-D616.
- Peyton,B.M.,Mormile,M.R.,&Alva,V.(2004).Cultures of haloalkaliphilic bacteria for the degradation of haloaromatic compounds.*Applied and Environmental Microbiology*,70(10),6098-6104.
- Pinar,G.,Poyntner,C.,et al.(2014).Hypersaline environments:a reservoir of salt-tolerant microorganisms and their potential for biotechnology.*Microbial Life of the Deep Biosphere*.De Gruyter.
- Rabouhi,L.,&Benbrahim,R.(2022).Essai de caractérisation d'exoenzymes produites par une bactérie extrêmophile du genre *Halorubrum*[Mémoire de Master,Université Mostaganem(UMAB),Algérie].
- Rajan,A.,Sudarkodi,C.,&Alagarsamy,S.(2008).Production and characterization of a surfactant-compatible alkaline protease from a halotolerant *Bacillus licheniformis*.*World Journal of Microbiology and Biotechnology*,24(10),2243–2250.
- Rampelotto,P.H.(2013).Extremophiles and extreme environments.*Life*,3(3),482-485.

Références bibliographiques

- Rizvi,A.,Ahmed,B.,Khan,M.S.,&Musarrat,J.(2024).Extremozymes from halophilic microorganisms:Catalytic properties and industrial applications.*International Journal of Biological Macromolecules*,258,Article 128910.
- Rothschild,L.J.,&Mancinelli,R.L.(2001).Life in extreme environments.*Nature*,409(6823),1092-1101.
- Saibi,A.N.E.,Nas,F.,Arab,M.,Aissaoui,N.,Boukeroui,Y.,&KloucheKhelil,N. (2022). Antimicrobial and Enzymatic Profiling of Halophilic and Halotolerant Bacteria from a Hypersaline Lake‘The Great Sebkha of Oran,Northwestern Algeria.’*Geomicrobiology Journal*,39(10),843-858.<https://doi.org/10.1080/01490451.2022.2079777>
- Salem,A.,Benammar,A.,Postec,A.,Fardeau,M.L.,&Boutaiba,S.(2021).Microbial diversity of Chott Ain Beida,a hypersaline lake in Southern Algeria.*African Journal of Microbiology Research*,15(2),110-120.
- Sarkar, S., Pal, A., & Dey, U. (2023). Factors affecting biosurfactant production: A comprehensive review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(1), 23-48.
- Sarubbo,L.A.,Silva,M.G.C.,Ferreira,J.M.,Aguiar,J.M.,Santos,M.O.,&Antunes,A.A.(2022).Bio surfactants:Production and applications in drug delivery,food and environmental industries.*Sustainability*,14(14),Article 8482.
- Sauer,T.,&Galinski,E.A.(1998).Bacterial solute transport:Outer membrane to ABC transporters.In *Molecular Biology of Psychrophilic Bacteria and Archaea*.Springer.
- Setati,M.O.(2010).Diversity and technological potential of haloalkaliphilic archaea and bacteria from Sudan salt lakes.*African Journal of Biotechnology*,9(54),9208–9214.
- Sharma, N., Singh, R., & Kapoor, S. (2022). Antimicrobial potential of halophilic bacteria from Indian salt pans. *Marine Biotechnology*, 24(4), 712-726.
- Singh, R., Singh, P., & Srivastava, S. (2022). Qualitative and quantitative screening of biosurfactants: Pitfalls and solutions. *Journal of Applied Microbiology*, 132(4), 2456-2473.

Références bibliographiques

- Sleator, R.D., & Hill, C. (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of compatible solutes. *Microbiology Letters*, 209(2), 131–139.
- Sohail, M., & Jamil, A. (2023). Potential of halotolerant rhizobacteria in mitigating salinity stress and promoting plant growth: A review. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(5), 2815–2832.
- Tanimura, A., Sugita, T., & Endo, A. (2016). Practical identification of yeasts and molds in food and the environment. In *Microbial Environmental Genomics (MEG)*. Springer.
- Ventosa, A., Arahal, D. R., & Mellado, E. (2022). The family *Halomonadaceae*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria* (3rd ed., Vol. 6, pp. 421–456). Springer.
- Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M., & McInerney, M.J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 339–347. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001>
- Zeng, X., Wang, Y., & Zhang, L. (2022). Proteases from halophilic bacteria: Diversity, mechanisms and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(8), 2893–2910.
- Zhao, H., Li, J., & Chen, G. Q. (2024). *Halomonas* as a platform for next-generation industrial biotechnology. *Metabolic Engineering*, 81, 45–58.
- Zhou, J., Liu, Y., Chen, X., & Wang, H. (2023). Comparative genomics of *Halomonas* species reveals adaptive traits to hypersaline environments. *Microbial Genomics*, 9(4), 000987.