



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie

# MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. : .....

---

Présenté et soutenu par :  
**GUIDADOU Chourouk et LAIADHI Reguia**

Le: 22 Juin 2022

## Thème

### **Contribution à l'étude des bactéries halophiles productrices de protéase des lacs salés**

#### **Jury**

Mme. BENAMEUR Nassima	MCB	Université de Biskra	Président
Mme. GHITI Hassina	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. BABA ARBI Souad	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2021 – 2022

## Remerciements

*Avant tout, louange à **DIEU** le tout puissant, le miséricordieux de nous avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance et de nous avoir permis de finaliser se travail dans de meillures condition. j'ai l'honneur et le plaisir de présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à notre encadreur Mme” **Ghiti Hassina**” pour son aide et ses conseils précieux et le temps qu'elle nous a donné pour nous former.*

*Nous remercions par ailleurs vivement les membres des Jury de nous avoir fait l'honneur de juger notre travail et d'assister à la soutenance.*

*Enfinement, nous remercions toutes les personnes qui ont participé de préson à la concétisation de ce mémoire.*

*Merci à tous*

## **Dédicace**

*A ma très chère mère*

*Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

*A mon très cher père*

*Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.*

*A mes très chers frères **Mohammed** et **mostafa** et À mes chères sœurs, **Anfal**, **Ikram**, **Nissrine** et **Arije**.*

*Puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite*

*À mon cher ami **Khedidja** pour me soutenir dans les moments difficiles.*

*A mon fiancé **Hamza.M** J'ai continué à donner des conseils, des encouragements et du soutien tout au long de mon étude.*

**Chourouk**

## **Dédicace**

*Je dédie ce travail*

*À mon cher Père*

*source de mes joies et secret de ma force, il sera toujours le  
modèle dans ta détermination, ta force et ta honnêteté  
puisse Dieu te préserver et t'accorder santé et une longue vie*

*À ma très chère Mère*

*Tu m'as comblé avec ta tendresse et ton affection tout au long de  
mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir, de me protéger et  
de m'encourager durant toutes les années de mes études. Puisse le tout  
puissant te donner santé, bonheur et longue vie*

*À mes frères : **Ahmed et Yossef***

*À mes sœurs : **Saaida, Sihem, Hadjer et Marwa***

*À toutes mes amies **Fatma, Amira, Soror, Ahlem, Aisha, Zahra et  
khadidja.***

*Pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire*

***Reguia***

# Sommaire

Remerciements.....	
Dédicace.....	
Liste des Tableaux .....	I
Liste des Figures.....	II
Liste des abréviations.....	III
Introduction.....	1

## Synthèse bibliographique

### Chapitre 01 : Les lacs salés

1.1. Définition des lacs salés.....	3
1.2. Composition ionique et concentration en sel.....	3

### Chapitre02 : les bactéries halophiles des lacs salés

2.1. Définition les halophiles et halotolérant .....	5
2.2. Habitat des bactéries halophiles .....	6
2.3. Classification des bactéries halophiles.....	7
2.3.1. Phylum <i>Proteobacteria</i> .....	7
2.3.2. Phylum <i>Firmicutes</i> .....	8
2.3.3. Phylum <i>Actinobacteria</i> .....	9
2.3.4. Phylum <i>Spirochaetes</i> .....	10
2.3.5. Phylum <i>Bacteroidetes</i> .....	10

### Chapitre03 : les applications des bactéries halophiles

3.1. Production d'enzymes.....	13
3.1.1. Protéases.....	13
3.1.2. Amylases .....	14
3.1.3. Lipase et estérase .....	15
3.1.4. Xylanase .....	16
3.1.5 Cellulase.....	17

## Patrie Exprimentale

### Chapitre 04 : Analyse d'articles

4.1. Zone d'étude.....	21
4.2. Matériel et méthode utilisés.....	21
4.2.1. Prélèvements et isolements des bactéries.....	21

4.2. 2. Les essais de production de protéase.....	22
4.2.3. L'identification des bactéries productrices des protéases .....	25

### **Chapitre 05 : Résultats et Discussion**

5.1. Isolement de bactérie productrice des protéases .....	31
5.2. Les caractères morphologiques .....	31
5.3. Les caractères Biochimiques et physiologiques .....	31
5.4. Analyse de séquence d'ADNr 16S.....	32
5.5. Cinétique de croissances et Production de protéase.....	34
Conclusion.....	40
Liste des références.....	42
Annexes.....	
Résumé.....	

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Groupe des microorganismes selon leurs tolérance au sel (kushner, 1985).....	6
<b>Tableau 2.</b> Différentes zones d'échantillonnages. ....	21
<b>Tableau3.</b> Liste du matériel et les milieux de culture utilisés pour chaque bactérie productrice de protéase. ....	23
<b>Tableau 4.</b> Les différentes méthodes utilisées dans chaque étude. ....	24
<b>Tableau 5.</b> Les éléments contenant du tompon PCR. ....	26
<b>Tableau 6.</b> Les différents caractères morphologiques des souches. ....	31
<b>Tableau 7.</b> Les différents tests biochimiques des souches. ....	32
<b>Tableau 8.</b> Activité protéasique (U/ml de surnageant) des bactéries halophiles isolées (Younse et <i>al.</i> , 2011).....	33
<b>Tableau 9.</b> Les différentes phases de croissances et l'activité protéolytique en fonction de temps.....	35
<b>Tableau 10.</b> Croissance et production de protéase avec différentes sources de nitrogène. ....	36
<b>Tableau 11.</b> Les facteurs de croissances de chaque souche étudiées.....	37

## Liste des Figures

<b>Figure 1:</b> A. Chott Melghir, B. Chott El Bieda Hammam Essoukhna (Site web 1), C. Great Salt Lake-USA(Landest,2019), D. Saline de San Fransisco-USA.(Jane,2020).....	3
<b>Figure 2:</b> Différents groupes de microorganismes halophiles (Larsen, 1962). .....	5
<b>Figure 3:</b> Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative de séquences de gènes ribosomiaux. Les groupes phylogénétiques contenant des membres halophiles et halotolérants sont encadrés en bleu (Oren, 2008). .....	7
<b>Figure 4:</b> Observation microscopique de bactérie <i>Shewanella oneidensis</i> la famille de Alteromonadaceae (Bowman et Meekin, 2005).....	8
<b>Figure 5:</b> Bactérie <i>Firmicutes</i> la famille de Bacillaceae.(Eugene, 2014).....	9
<b>Figure 6:</b> Micrographie électronique à balayage de <i>Micromonospora echinospora</i> . (Li et al., 2016). .....	9
<b>Figure 7:</b> Microscopie électronique de la souche DK1 (isolat cutané du Danemark) non fixée et colorée en négatif. Cette souche est constituée de deux <i>Borrelia</i> morphologiquement distinctes : (A) petite et (B) grande. Barre d'échelle $\frac{1}{4}$ 1 m ; grossissement $\frac{1}{4}$ 10 260 (karami et al., 2014).....	10
<b>Figure 8:</b> Micrographie électronique à balayage de la souche M31 T de <i>Salinibacter ruber</i> . Barre, 2n5µm (Francisco et al., 2002). .....	11
<b>Figure 9:</b> Structure tridimensionnelle de protéase ( Borrell, 2018). .....	14
<b>Figure 10:</b> Strcture tridimensionnelle de alpha amylase (Mohsen et Fahimeh, 2013).....	15
<b>Figure 11:</b> Structure tridimensionnelle de Lipase et estérase(Tan et al., 2008).....	16
<b>Figure 12:</b> Structures tridimensionnelle de xylanase (Morin et Harp, 2010).....	17
<b>Figure 13:</b> Structure tridimensionnelle de cellulase (Parsiegla et al., 2002).....	18
<b>Figure 14:</b> Les différentes étapes du séquençage de gène d'ADN (Seydina et al., 2014)....	28
<b>Figure 15:</b> Protocol d'extraction ADN à l'aide de méthode d'extraction de Kit (Melih et al.,2019).....	29
<b>Figure 16:</b> Identification bactérienne issue extraction d'ADN génomique (Catherine et al.,2005).....	29
<b>Figure 17:</b> Arbre de jonction de voisinage montrant la position de l'isolat BA17 avec les autres membres du groupe <i>Bacillus subtilis</i> (Ozlem et al.,2007). .....	34



## Liste des abréviations

**M** : Molarité

**pH** : Potentiel hydrique

**(P/V)** : Point par volume

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNr 16S** : Gène codant pour ARN ribosomique 16S

**ARNr 16S** : Acide ribonucléique 16S

**g/l** : gramme par litre

**LB** : Luria Bertani

**PBS** : Phosphate Buffer Saline

**h** : heures

**mM** : millimol

**TCA** : Acide Tri chloro acétique

**nm** : nano mètre

**VP** : Voges Proskauer

**PCR** : Amplification en Chaîne par Polymérase

**ng** : nanogramme

**ul** : microlitre

**uM** : micro mol

**BLAST** : Basic Local Alignment Search Tool for nucleotide

**EMBL** : European Molecular Biology Laboratory

**DDBJ** : DNA Data Bank of Japan

**MEGA** : Molecular Evolutionary Genetics Analysis

**NCBI** : National Center for Biotechnology Information

**dNTP** : mélange des quatre désoxy nucléotides

**Pb** : Paire de base

# **Introduction**

## Introduction générale

Ces dernières années, la recherche sur la biodiversité microbienne des environnements hypersalins s'est multipliée. Le nombre des études visant une compréhension approfondie de ces écosystèmes comme le Grand lac salé, Utah (USA), la Mer Morte, les marais salants de plusieurs pays et les lacs alcalins à savoir le Lac Magadi à Kenya s'est considérablement développé (D'Alessandro et *al.*, 2006). Les bactéries halophiles qui s'adaptent à l'environnement hautement salin. Leurs faibles besoins nutritionnels et leur résistance à de fortes concentrations de sel, les introduisent en tant que agents puissants dans un large éventail d'applications biotechnologiques. Les bactéries comptent plus de 150 espèces introduites dans 70 genres des bactéries (Fatemeh et *al.*, 2010).

Cependant, La recherche sur les enzymes hydrolytiques des organismes halophiles a été lancée par Nordberg et Hofsten à la fin des années 60 (Nordberg et Hofsten, 1969). Depuis, un nombre considérable d'efforts a été consacré à l'évaluation des enzymes produites par les bactéries modérément halophiles, Comme les enzymes actuelles ne suffisent pas à répondre à la plupart des demandes industrielles, l'isolement et la caractérisation des extrêmophiles ont attiré l'attention des chercheurs (Patel et *al.*, 2005).

Une partie des enzymes issus des souches bactériennes isolées des lacs et des marais salants, en raison de leur adaptation à de hautes concentrations salines et au pH alcalin. Elles sont souvent thermostables (Moreno et *al.*, 2009). Ces propriétés ont fait des enzymes halophiles d'excellents candidats pour différentes applications biotechnologiques car elles pourraient catalyser des réactions dans des conditions dures, typiques de nombreux processus industriels et pharmaceutique (Setati, 2010).

En outre, ils ont un grand potentiel dans la bioremédiation de divers polluants organiques et inorganiques de l'environnement, parmi les enzymes halophiles ou cité les protéases sont largement appliquées dans l'industrie, la médecine et la technologie biologique (Carlos et Judith, 2008).

Les protéases jouent donc un rôle important dans l'industrie pharmaceutique en tant que biomarqueurs de diagnostic et sont utilisées en médecine, que ce soit pour leur fonction native ou pour des fonctions totalement artificielles. Les protéases contribuent également à la transformation, à la maturation ou à la destruction d'ensembles spécifiques de protéines végétales en fonction d'indices de développement ou de variations environnementales. Ce qui

a accéléré le développement de thérapies ciblées sur les protéases pour le traitement de maladies très importantes pour la vie humaine. Les protéases sont également au centre de l'attention de l'industrie biotechnologique en raison de leur utilité en tant que réactifs biochimiques ou dans la fabrication de nombreux produits(Narendra et *al.*,2018 ).

### **Problématique**

Les cercles ultra-salins des lacs salés et des sommités sont un modèle d'environnements contenant un complexe de bactéries halophiles intéressantes

Dans ce travail, diverses espèces produisant des protéases halophyloques ont été isolées de divers lacs, ainsi que la connaissance des facteurs affectant la production de protéase qui joue un rôle important dans l'industrie et les produits pharmaceutiques.

### **L'objectif de notre étude est :**

L'objectif de ce présent travail est une analyse bibliographique à partir des travaux originaux sur des bactéries halophiles productrices de protéases provenant de différents lacs salés.

Notre mémoire est organisé en deux parties principales, chacune organisée en chapitres.

Ainsi, Partie bibliographique contient trois chapitres :

**Chapitre I :Les lacs salés.**

**Chapitre II :les bactéries halophiles des lacs salés.**

**Chapitre III :les applications des bactéries halophiles.**

Ensuite, la partie expérimentale, qui comprend deux chapitres:

**Chapitre IV:Matériels et méthodes.**

**Chapitre V:Résultats et discussions.**

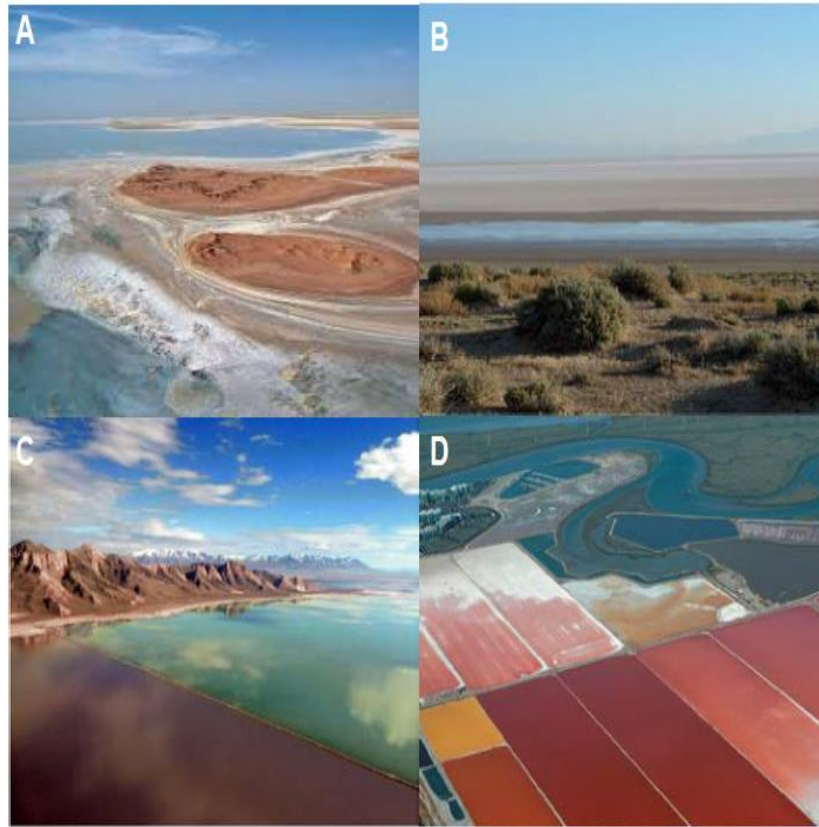
Notre travail termine par une conclusion générale,des perspectives de recherche et des recommandations.

# **Synthèse bibliographique**

# **Chapitre 01 : Les lacs salés**

### 1.1. Définition des lacs salés

Sont des zones humides géographiquement très répandues. La nature des ions dominants dans les lacs hypersalins dépend des conditions topographiques, géologiques et climatiques environnantes (Madigan et Martinko, 2007)(Fig.1).



**Figure 1:** A. Chott Melghir, B. Chott El Bieda Hammam Essoukhna (site web 1), C. Great Salt Lake-USA(Landest,2019), D. Saline de San Fransisco-USA.(Jane,2020)

### 1.2. Composition ionique et concentration en sel

Les milieux hypersalins sont principalement caractérisés par leur concentration en sels totaux, mais leur composition ionique est un déterminant principal du biome environnemental (Oren, 2006a) Ces ions peuvent être des minéraux ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ , etc.) ou organiques (acétates, carbonates, citrates, nitrates) et monoatomiques ( $\text{F}^-$ ) ou polyatomiques ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) (Taha, 2020). Dans le contexte des milieux hypersalins, le terme sel est utilisé pour définir une combinaison inorganique de différentes molécules ioniques « anions et cations »,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$  étant les plus abondants. Un milieu est dit hypersalin lorsque la concentration en sel est supérieure à celle de l'eau de mer (environ 35 g/L) ( DasSarma, 2017). Cependant, le concept de salinité élevée peut faire référence à une salinité plus élevée, parfois même proche des conditions de saturation (Oren, 2002).

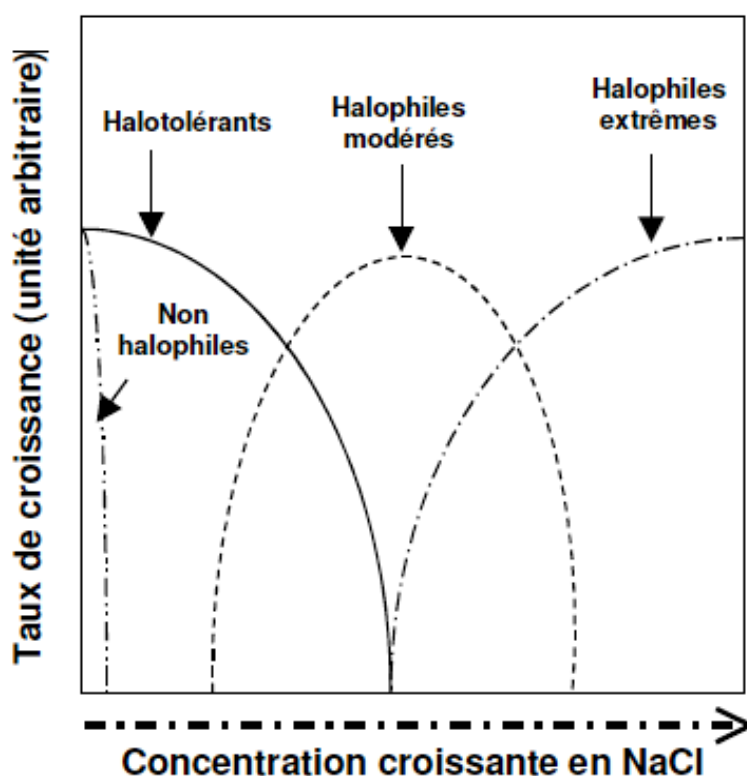
# **Chapitre02 : les bactéries halophiles des lacs salés**



## 2.1. Définition les halophiles et halotolérant

Les halophiles et les halotolérants présentent une grande diversité phylogénétique. On les trouve dans les trois domaines du vivant : Archaea, Bacteria et Eucarya (Oren, 2002).

Le terme « Halophiles » sont des bactéries nécessitant la présence de sel (NaCl) dans le milieu pour leur croissance. En revanche, le terme « halotolérant » signifie la tolérance de la bactérie à différentes concentrations en sel durant leur croissance. Les bactéries nécessitant moins de 1 % (p/v) de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérées comme halophiles. En 1962, Larsen a défini 3 catégories de bactéries halophiles selon la concentration en sel qui amène à une croissance optimale des bactéries (Bertrand & Larsen, 1989). Cette concentration peut varier de 1 à 6 % (p/v) pour les bactéries faiblement halophiles, de 3 à 15 % (p/v) pour les bactéries halophiles modérées et jusqu'à 15-30 % (p/v) pour les bactéries halophiles extrêmes. Par ailleurs, les bactéries halotolérantes acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leur croissance (Fig.2) (Larsen, 1962).



**Figure 2:** Différents groupes de microorganismes halophiles (Larsen, 1962).

La classification de Kushner (1978, 1985) demeure la classification largement acceptée, cette dernière est illustrée dans le tableau ci-dessous avec (Kushner, 1985) (Tab.1).

**Tableau 1:** Groupe des microorganismes selon leurs tolérance au sel (kushner,1985).

Catégories	Taux en sel pour la croissance	Des exemples des microorganismes
Non halophiles	Croissance meilleure dans un milieu contenant moins de 0,2 M de sel.	La majorité des bactéries d'eau douce
Halotolérants	Non halophile qui tolèrent la présence de sel; si l'intervalle de la croissance dépassent les 2.5 M de sel.	<i>Staphylococcus aureus</i>
Légèrement halophiles	Présentent une bonne croissance dans un milieu contenant de 0.2-0.5 M de sel.	La majorité des bactéries marines.
Halophiles modérées	Présentent une bonne croissance dans un milieu contenant de 0.2- 2.5 M de sel.	<i>Salinivibrio costicola</i>
Halophile faible	Présentent une bonne croissance dans un milieu contenant de 1.5- 4.0M de sel.	<i>Halorhodospira halophila</i>
Halophiles extrêmes	Présentent une bonne croissance dans un milieu contenant de 2.5- 5.2 M de sel.	<i>Halobacterium salinarum</i>

## 2.2. Habitat des bactéries halophiles

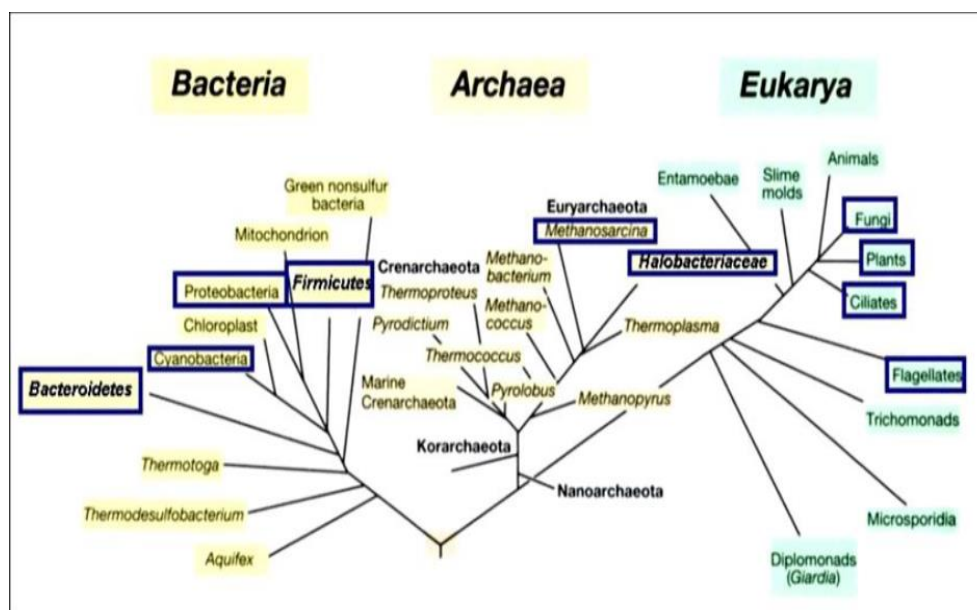
Les habitats hypersalins se sont formés au cours d'une longue période de l'histoire de la Terre. Ils se caractérisent par une faible diversité microbienne (Rodriguez Valera, 1993 ; Ventosa et Nieto, 1995).

Les bactéries halophiles sont présentes là où il y a de fortes concentrations de sel, dans les lacs hypersalins (Oren, 2011).

Comme les Grands Lacs Saumâtres dans l'Ouest américain, le Lac Rose au Sénégal, la Mer Morte et les sols salins dans certains endroits inattendus ainsi que la saumure au fond de la mer, chez les plantes qui sécrètent du sel par leurs feuilles, les marais d'Afrique du Nord, les marais salants d'Espagne, de France, etc. La diversité des bactéries vivant dans ces biotopes dépend principalement de la salinité, de la solubilité en oxygène, de la solubilité ionique, de l'humidité et de la température. Structure ionique et, dans certains cas, pH.

### 2.3. Classification des bactéries halophiles

Le domaine Bacteria regroupe la plus grande diversité des halophiles qui sont majoritairement représentés par des espèces halotolérantes et halophiles modérées que des halophiles extrêmes (Anton et al., 2002). Elles sont identifiées dans de nombreux phyla répartissant dans un grand nombre de groupes phylogénétiques très hétérogènes (Fig.3) : *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Gammaproteobacteria* et *Spirochaetes* (Habaet al., 2011).



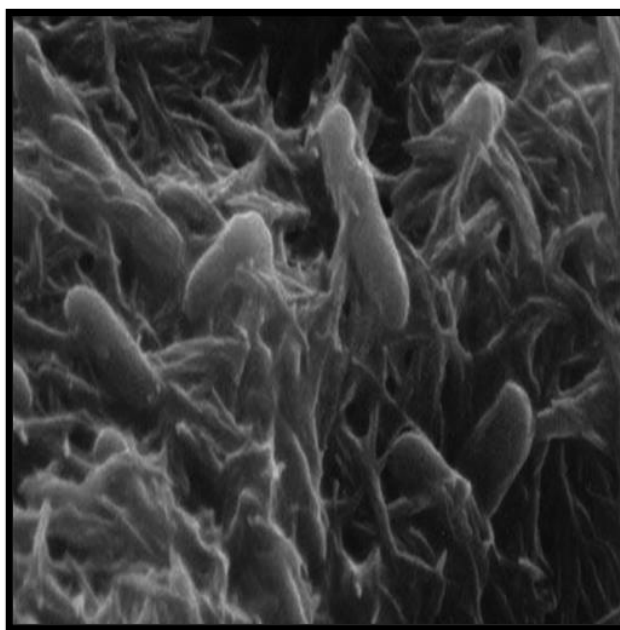
**Figure 3:** Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative de séquences de gènes ribosomiaux. Les groupes phylogénétiques contenant des membres halophiles et halotolérants sont encadrés en bleu (Oren, 2008).

#### 2.3.1. Phylum *Proteobacteria*

Le phylum *Proteobacteria* a été proposé par Garrity et al., (2005) sur la base de l'analyse phylogénétique des séquences du gène codant l'ARNr 16S. Les bactéries appartenant à ce phylum sont très ubiquitaires et hétérogènes avec des propriétés physiologiques diverses. Ils contiennent 5 classes différentes de bactéries à Gram négatif :

*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* et *Epsilonproteobacteria* (Brenner et al., 2005).

La famille des *Halomonadaceae* de la classe *Gammaproteobacteria* contient le nombre le plus important d'espèces halophiles modérées (Franzmann et al., 1988). Cette famille comprend trois genres de bactéries halophiles extrêmes apigmentées (Maturrano, 2006 ; Sorokin et al., 2006) dont une des espèces a été isolée de sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila) en Algérie (Kharroub et al., 2006). La famille des *Alteromonadaceae* (Fig.4). (Ivanova et Mikhailov, 2001), inclut des protéobactéries halophiles modérées dont le genre *Marinobacter* (Gauthier et al., 1992).



**Figure 4:** Observation microscopique de bactérie *Shewanella oneidensis* la famille de *Alteromonadaceae* (Bowman et Meekin, 2005).

### 2.3.2. Phylum *Firmicutes*

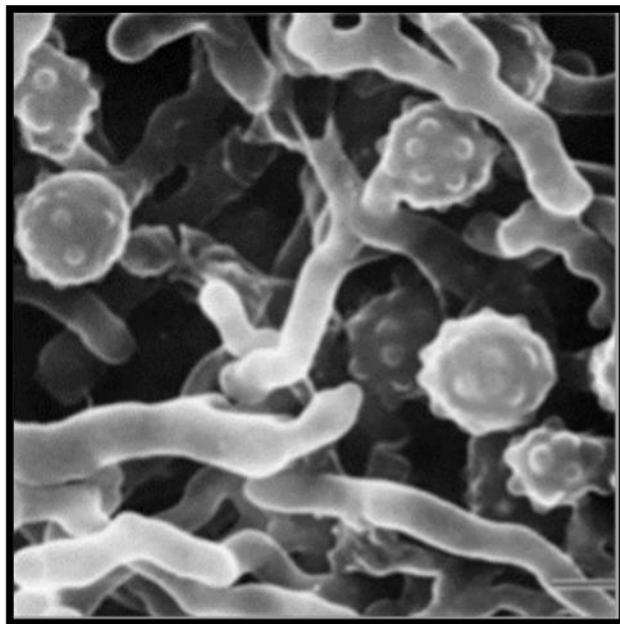
Les membres du phylum *Firmicutes* sont hautement diversifiés au niveau morphologique et physiologique et sont capables d'habiter une grande variété d'environnements tels que les habitats hypersalins. La famille des *Bacillaceae* appartenant à ce phylum est la plus importante avec 21 genres *Bacillus* (Fig.5) (Ludwig et al., 2008).



**Figure 5.** Bactérie *Firmicutes* la famille de *Bacillaceae*.(Eugene,2014)

### 2.3.3. Phylum *Actinobacteria*

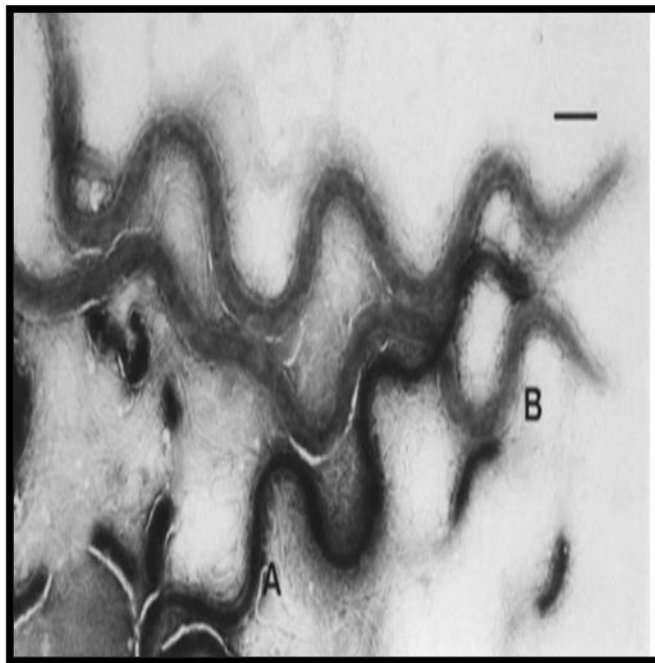
La classe *Actinobacteria* constitue l'un des principaux groupes du domaine *Bacteria* (Ludwig Klenk., 2001) répartie en 48 familles (Zhi et *al.*, 2009). Elle contient des bactéries halophiles incluses dans l'ordre des *Actinomycetales* (Fig.6). (Stackebrandt et *al.*, 1997; Zhi et *al.*, 2009).



**Figure 6:** Micrographie électronique à balayage de *Micromonospora echinospora*. (Li et *al.*, 2016).

### 2.3.4. Phylum *Spirochaetes*

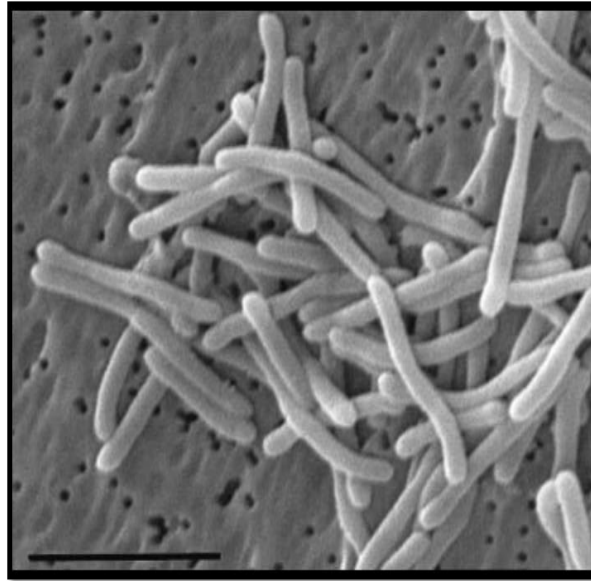
Quatre espèces modérément halophiles des Spirochètes (Fig.7) .Ont été décrites, appartenant au genre *Spirochaeta*. Il s'agit de *Spirochaeta halophila* (Greenberg et Canale-Parola, 1976) des espèces *holoalcaliphiles* (*Spirochaeta africana* et *Spirochaeta alkalica*) et de *Spirochaeta asiatica* (Zhilina et al., 1996).



**Figure 7:** Microscopie électronique de la souche DK1 (isolat cutané du Danemark) non fixée et colorée en négatif. Cette souche est constituée de deux *Borrelia* morphologiquement distinctes : (A) petite et (B) grande. Barre d'échelle  $\frac{1}{4}$   $\mu$ m ; grossissement  $\frac{1}{4}$   $\times$  10 260 (Krami et al.,2014).

### 2.3.5. Phylum *Bacteroidetes*

Ce phylum se compose de trois classes *Bacteroidia*, *Flavobacteria* et *Shingobacteria* (Garrity et Holt, 2001). Ces dernières incluent des espèces halophiles faibles et modérées (Denger et al., 2002 ; Donachie et al., 2004 ; Nedashkovskaya et al., 2005) et uniquement quatre espèces halophiles extrêmes aérobies et pigmentées : *Salinibacter ruber*(Fig.8). (Antón et al.,2002). *Salinibacter iranicus*, *Salinibacter luteum* (Makhdoumi-Kakhki et al.,2012) et *Salisaeta longa* (Vaisman et Oren, 2009).



**Figure 8:** Micrographie électronique à balayage de la souche M31 T de *Salinibacter ruber*. Barre, 2n5 $\mu$ m (Francisco et *al.*,2002).

**Chapitre 03 : les  
applications des bactéries  
halophiles**



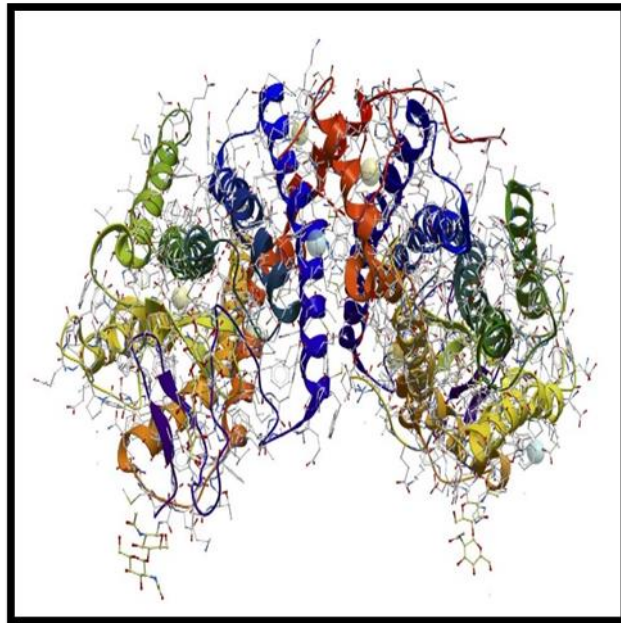
### 3.1. Production d'enzymes

Les halophiles produisent de nombreuses enzymes (protéases, lipases, amylases, etc.) Ces enzymes sont de bons candidats pour des applications industrielles du fait de leur capacité d'activité en présence de fortes concentrations en sel, de tolérer des températures relativement élevées et des variations de pH etc. (Amoozegar et *al.*, 2017).

#### 3.1.1. Protéases

Les protéases représentent l'un des groupes les plus importants d'enzymes industrielles. et représentent environ 60 % des ventes totales industrielle dans le monde (Gupta et *al.*, 2002; Madhavi et *al.*, 2011). Ils sont utilisés dans toutes sortes de situations industrielles telles que la fabrication de médicaments, les produits pharmaceutiques, , les détergents, les formulations de nettoyage de surface, le traitement des déchets, la récupération de l'argent, les suppléments digestifs, les additifs agrochimiques et les réactifs de diagnostic (Kumar et Takagi, 1999). ces enzymes sont classées comme endo ou exoenzymes sur la base de leur site d'action sur des substrats protéiques (Rao et *al.*, 1998).

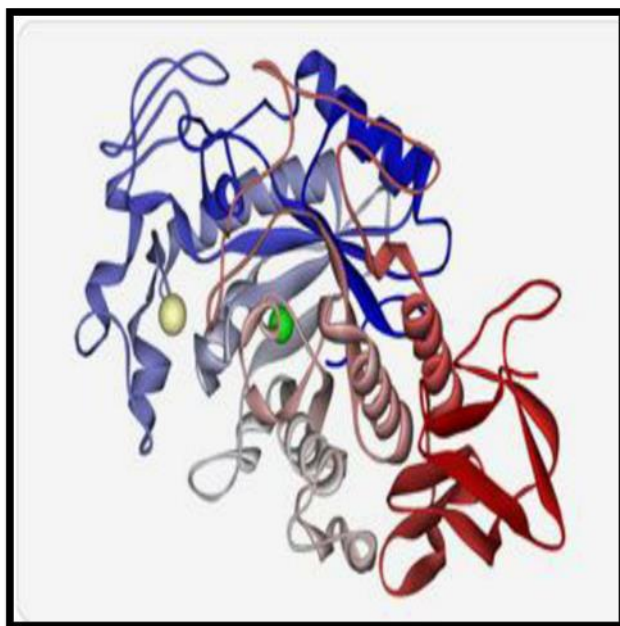
Les protéases intracellulaires sont importantes pour divers processus cellulaires et métaboliques, comme la différenciation, le renouvellement des protéines et la maturation des enzymes et des hormones. Les protéases extracellulaires importantes pour l'hydrolyse des protéines dans des environnements sans cellules et permettent à la cellule d'absorber et d'utiliser les produits hydrolytiques. Et les protéases extracellulaires ont également été exploitées commercialement pour faciliter la dégradation des protéines dans divers processus industriels (Kumar et Takagi, 1999). Certaines espèces de bactéries halophiles (telles que *Pseudoalteromonas sp.* Souche CP76 (Sánchez-Porro et *al.*, 2003) et *Bacillus clausii* (Kumar et *al.*, 2004) ont été utilisés pour la production de protéases (Lama et *al.*, 2005)(Fig.9).



**Figure 9:** Structure tridimensionnelle de protéase.( Borrell, 2018).

### 3.1.2. Amylases

Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent les molécules d'amidon pour donner divers produits, notamment des dextrans et des polymères de plus en plus petits composés d'unités de glucose (Windish et Mhatre, 1965). Ces enzymes sont d'une grande importance dans la biotechnologie d'aujourd'hui avec des applications allant de l'alimentation, la fermentation, textile et de papier (Pandey et al., 2000), détergents, biocarburants et la production d'alcool (Aggarwal et al., 2019). Récemment, l'alpha-amylase a suscité une grande attention en raison de son large éventail d'applications et de ses mérites économiques (Bansode, 2010). Ces enzymes montrent une activité maximale à des concentrations de 10-200 g/l de NaCl, de pH entre 7 et 8, et à des températures entre 50 et 60°C. Les bactéries halophiles qui produisent des alpha amylases comprennent *Haloarcula hispanica*, *Halobacillus sp.*, *Chromohalobacter sp.*, *Bacillus dipsosauri* et *Halomonas meridiana* (Kathiresan et Manivannan, 2006) (Fig. 10).

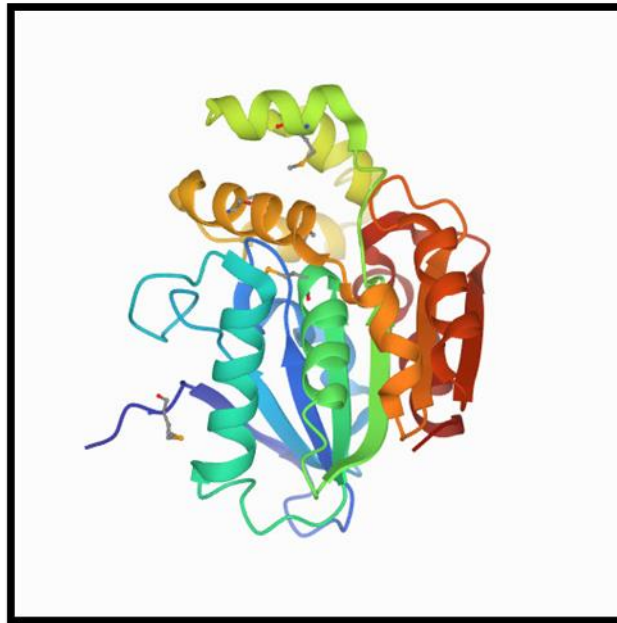


**Figure 10:** Structure tridimensionnelle de alpha amylase (Mohsen et Fahimeh, 2013).

### 3.1.3. Lipase et estérase

Les lipases et les estérases sont deux des biocatalyseurs les plus importants dans les applications biotechnologiques. Ces enzymes se distinguent essentiellement en fonction de la spécificité de leur substrat. Les lipases hydrolysent de préférence les triglycérides composés d'acides gras à longue chaîne et les estérases hydrolysent généralement les esters hydrosolubles, y compris les triglycérides d'acides gras à courte chaîne (Verger, 1997).

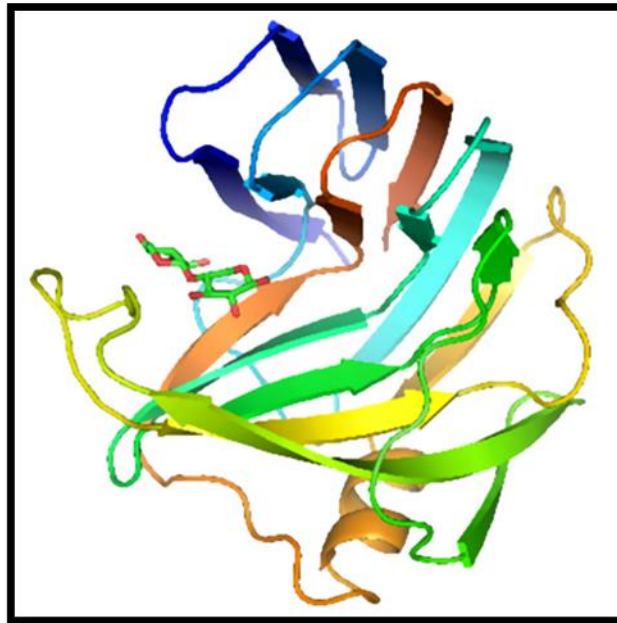
Ces deux enzymes ont diverses applications, notamment la modification de molécules biologiquement actives, l'amélioration de la saveur ou des propriétés nutraceutiques des aliments, et la résolution de mélanges racémiques (Bornscheuer et Kaslauskas, 1999; Jaeger et Eggert, 2002; Schmid et Verger, 1998; Sharma et al., 2001). Il est remarquable qu'en présence de certains solvants organiques, elles effectuent des réactions d'estérification, d'amidation et de polymérisation (Bornscheuer et Kaslauskas, 1999; Schmid et Verger, 1998; Sharma et al., 2001). Ces enzymes montrent une activité optimale à des concentrations de NaCl entre 30 et 300 g/l, des valeurs de pH entre 8 et 9 et des températures entre 40 et 60°C (Litchfield, 2011). Les bactéries halophiles des espèces appartenant aux genres *Marinobacter*, *Halomonas*, *Chromohalobacter* et *Geomicrobium* se sont puissants producteurs de lipase (Kumar et al., 2012) (Fig.11).



**Figure 11:** Structure tridimensionnelle de Lipase et estérase (Tan et *al.*, 2008).

#### 3.1.4. Xylanase

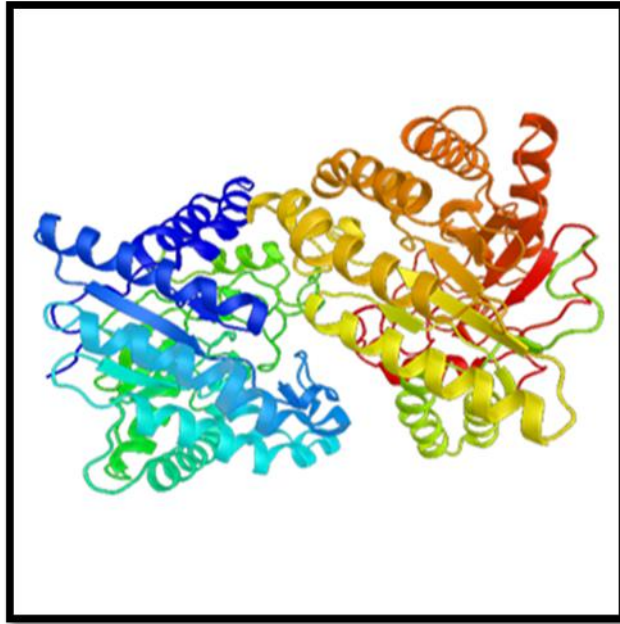
Les xylanases ( $\beta$ -1,4-D-xylan xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) sont des enzymes hydrolytiques qui clivent de manière aléatoire (Collins et *al.*, 2005). Ces enzymes très importantes dans les applications de quelques secteurs industriels, notamment la bioconversion de la matière cellulosique en produits à valeur ajoutée (Butt et *al.*, 2008), la délignification de la pâte à papier (Gübitz et *al.*, 1997), la production de biocarburant, de pâte à pain et d'amidon à partir de la dégradation de matières lignocellulosiques (Khandeparker et Numan, 2008). Quelques bactéries halophiles produisent la xylanase *Glaciecola mesophila* (Guo et *al.*, 2009), *Chromohalobacter sp.* (Prakash et *al.*, 2009) et *Nesterenkonia sp.* (Govender et *al.*, 2009) (Fig. 12).



**Figure 12:** Structures tridimensionnelle de xylanase (Morin et Harp, 2010).

### 3. 1.5 Cellulase

Les cellulases hydrolysent les liaisons  $\beta$ -1,4-D-glucosidiques de la cellulose, (ShaoMin et Guang 2013). Il existe trois groupes principaux d'enzymes cellulolytiques : l'endocellulase, l'exocellulase et la  $\beta$ -glucosidase (Karnchanatat et *al.*, 2008), qui agissent ensemble pour hydrolyser complètement les liaisons  $\beta$ -1,4-D-glycosidiques de la cellulose pour former du glucose (Bhat et Bhat 1997 ; Bhat 2000). Ces enzymes sont utilisées dans divers domaines, tels que l'industrie alimentaire, l'industrie du textile et de la blanchisserie, l'industrie du papier, l'industrie agrochimique, la science biomédicale et les additifs alimentaires (Zhang et *al.*, 2012). *Halocella cellulolytica* a été la première bactérie productrice de cellulase découverte par Bolobova et *al.*, 1992. L'espèce *Halomonas sp.* est connue pour produire de la cellulase dans des conditions salines de 6 % de NaCl. L'activité maximale de pH 7,1 et températures à 50°C (Shivanand et *al.* 2013) (Fig.13).



**Figure 13:** Structure tridimensionnelle de cellulase (Parsiegla *et al.*, 2002).

# **Partie Expérimentale**

# **Chapitre 04 : Analyse d'articles**



#### 4.1. Zone d'étude

Dans le but est d'étudier la diversité des communautés microbiennes, nous avons analysé des articles de différentes régions salines (Tab.1)

**Tableau 2.** Différentes zones d'échantillonnages.

Référence	(Younse et <i>al.</i> ,2011)	(Karan et <i>al.</i> ,2011)	(Nika et <i>al.</i> ,2018)	(Ozlem et <i>al.</i> ,2007)	(Gopal et <i>al.</i> ,2007)
<b>Zone</b>	Lac salé Moharloo dans le sud de Shiraz (Iran)	lac salé Sambhar (Inde)	Lac salé Iran	lac Van (turkya)	Lac Nainital (Inde)

#### 4.2. Matériel et Méthode

##### 4.2.1. Prélèvements et isolements des bactéries

(Younse et *al.*, 2011) ont utilisé des échantillons de sédiments et d'eau collectés dans différentes parties du lac salé Moharloo.

-Dilutions en série

-Ensemencés sur gélose à 7% NaCl

- Incubation 24 heures à 37°C

-Les colonies individuelles ont été examinées pour leur activité protéolytique dans un milieu gélosé salin (voire annexe 1).

(Karan et *al.*,2011) a employé Pour l'isolement des microorganismes halophiles, des échantillons d'eau ont été prélevés à différents endroits du lac salé Sambhar.

-Les cultures ont été diluées en série et inoculés sur un milieu gélose

-Incubés à 37 °C pendant 48 h

-Les colonies pures ont été ramassées et striées sur une gélose.

-Enrichissement en sel à l'aide d'un bouillon nutritif halo-alcalin (BPCOM) (voire annex2).

Par contre, Nika et *al.*,2018 les échantillons ont été prélevés aseptiquement dans différents districts salés d'Iran.

-L'isolement des bactéries halophiles est effectué après d'un enrichissement été du milieu d'agar modifié par (LB) (voire annexe 3).

-1 g de sol a été mis en suspension dans 1 mL de solution saline tampon de phosphate stérile (PBS) contenant 20 % de NaCl,

-Vortexing, 500 µL de suspension a été réparti sur d'agar LB.

-Incubation à 37 °C pendant 48 h

Ainsi que, Ozlem et *al.*,2007 les échantillons ont été prélevés à partir les sédiments du lac Van

-Inoculés dans 5 ml de milieu de croissance (voire annexe 4)

-Incubés pendant une nuit à 37°C

-Traitement pendant 10 min à 80°C

-Les échantillons dilués ont été placés sur d'agar (voire annexe 5)

-Le pH du milieu a été ajusté à 9,6

- Incubation à 37 °C pendant 24-48 h. La souche BA17 qui a produit une activité protéase maximale dans le milieu liquide a été sélectionnée.

On outre, Gopal et *al.*,2007 ont été prélevés les échantillons d'eaux de lac Nainital dans Inde , l'isolement des bactéries ont été dilués en série et déposée sur lait écrémée.

## **4.2. 2. Les essais de production de protéase**

### **4.2.2.1 Production de protéase**

Dans ce travail, basé sur la production de protéase par des bactéries halophiles des différents lacs salés, le tableau qui suit contient le matérielles et réactifs nécessaires.(Tab.3).

**Tableau 3:** Liste du matériel et les milieux de culture utilisés pour chaque bactérie productrice de protéase.

	(Younse <i>etal.</i> ,2011)	(Karan <i>et al.</i> ,2011)	(Nika <i>et al.</i> ,2018)	(Ozlem <i>et al.</i> ,2007)	(Gopal <i>et al.</i> ,2007)
Bactérie	Bactérie halophile <i>Bacillus. sp</i>	<i>Geomicrobium sp.</i> EMB2 (MTCC10310)	<i>Salicola marasensis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> souc heBA17	<i>Bacillus cereus</i> MTCC 6840
Matériel	Flacons erlenmeyer de 250 ml Centrifugeuse Agitateur	Erlenmeyer de 150 ml Centrifugeuse Agitateur continu spectrophotométrie	Ballons erlenmeyer de 250 mL Autoclave spectrophotométrie	Flacon erlenmeyer de 250 ml Agitateur orbital	Flacons Erlenmeyer agitateur orbital Centrifugeuse
Milieu de culture	50 ml de bouillon de lait écrémé salé	25 ml bouillon de gélatine	50 ml milieu basal	50 ml milieu de base	Milieu GYP à 10 % (v/v) d'une culture de semences
pH	8,0	8,0	pH a été ajusté à 7,4	pH du milieu a été ajusté à 9,0 par une solution composée des carbonates	7,5
Incubation	à 37 °C	à 30°C	à 37 °C	à 37 °C	à 30°C pendant 48 heures
agitation	150rpm	à 150 rpm pendant 72 heures	150 tr/min pendant 120 h	180rpm	165 rpm
Centrifugation	4500×g pendant 10 minutes à 4 °C	à 10 000×g pendant 10 minutes à 48C	8000× g pendant 10 min		10000 rpm à 4°C pendant 10 minutes.
Absorbance		OD660nm	OD600~ 1	600nm	610 nm

Surnageant	Surnageants exempts des cellules ont été utilisés comme enzyme brute pour le dosage des protéases extracellulaires.	filtration à travers une membrane filtrante en acétate de cellulose (0,2 mm), a été utilisé comme source de protéase brute.	surnageant exempt de cellules a été dosé pour l'activité protéolytique extracellulaire.	utilisés pour l'activité enzymatique.	utilisés pour l'activité enzymatique protéolytique.
------------	---	---	---	---------------------------------------	---

#### 4.2.2.2 Essai de protéase :

Dans cette phase du travail, l'activité protéolytique de protéase est mesurée à l'aide de différentes méthodes (Tab.4).

**Tableau 4.** Les différentes méthodes utilisées dans chaque étude.

	(Younse et <i>al.</i> ,2011)	(Karan et <i>al.</i> ,201)	(Nika et <i>al.</i> ,2018)	(Ozlem et <i>al.</i> ,2007)	(Gopal et <i>al.</i> ,2007)
Utilisé caséine comme un substrat	1,1 ml	3 ml	0,5 ml	2,5 ml	4 ml
Tompons	0,1 mM de Tris-HCl	20 mM de Borax-NaOH	50 mM de Phosphat	50 mM de Glycimi-NaOH	50 mM de Tris-HCl
pH de tompons	8	10	8	10,5	7,5
NaCl de tompons	#	5 % (p/v)	20 % (p/v)	#	#
1ère incubation	37°C pendant 30 min	37°C pendant 20 min	40°C pendant 15 min	30°C pendant 20 min	30°C pendant 5 min
Arrête de réaction	Addition par 1,8 ml TCA	Addition par 3,2 ml TCA	Addition par 0,5 ml TCA	Addition par 2,5 ml TCA	Addition par 5 ml TCA
2ème incubation	#	37°C pendant 30 min	37°C pendant 15 min	30°C pendant 30 min	#
Centrifugation	4000 pendant 20 min	#	18000 pendant 10 min	#	#
Absorbances	280 nm	280 nm	660 nm	660 nm	275 nm

L'activité protéolytique est mesurée par l'absorbance. Dont  $\lambda$  varie de 275-660 nm (voire tab.4) pour différents échantillons.

La courbe d'étalonnage est effectuée à l'aide d'une solution standard de tyrosine. L'unité d'activité protéolytique est exprimée par 1  $\mu$ mol de tyrosine libéré par  $\mu$ mol/ml.

#### **4.2.3. L'identification des bactéries productrices des protéases**

##### **4.2.3.1. Identification morphologique**

(Younse et *al.*, 2011) ont dit que les caractéristiques morphologiques et culturelles des isolats producteurs de protéases ont été étudiées en les comparant au Bergey Manuel of bacteriology.

(Nika et *al.*, 2018) ont prélevé une souche pure sélectionnée ensemencé sur d'agar Luria Bertani (LB)

-Incubée pendant 48 h à 37 °C,

-Les tests morphologiques appliqués étaient la coloration gram, la vérification de la forme et de la couleur de la colonie, et capacité de formation de spores.

En plus, Ozlem et *al.*, 2007 identifier seulement les caractères morphologiques de *Bacillus licheniformis* souche BA17, coloration de Gram, forme cellulaire, élévation, borduré, pigment, milieu de croissance.

Ainsi que, Gopal et *al.*, 2007 ont étudiés *Bacillus cereus* MTCC 6840 pour déterminer les caractères morphologiques (coloration de Gram, coloration de endospore, forme cellulaire, élévation, borduré, pigment, croissances de Macconkey agar, Fluorescence, croissance sur gélose au furazolidone, croissance anaérobie.

##### **4.2.3.2 Identification biochimique**

Nika et *al.*, 2018 ont étudié les caractéristiques biochimiques et physiologiques ont été déterminées à l'aide d'une culture LB de 48 h de l'isolat purifié et comprenaient des essais de catalase et d'oxydase, de motilité, de Voges-Proskauer et de rouge de méthyle, de croissance à différentes températures, de valeurs de pH et de concentrations de NaCl. La fermentation de certains sucres, l'hydrolyse de l'amidon, de la gélatine, de la caséine, de la réduction du nitrate, du H<sub>2</sub>S et de la production indole.

Cependant, Gopal et *al.*, 2007 a utilisé des tests biochimiques que sont : production de H<sub>2</sub>S, motilité, catalase, oxydase, Vp, indol, amidon, caséine, gélatine, utilisation de citrate.

##### **4.2.3.3 Identification moléculaire**

Younse et *al.*, 2011 a étudié l'amplification de PCR de gène ADN<sub>r</sub> 16S

-L'ADN purifiés des bactéries produisant des protéases ont été cultivés dans un bouillon nutritif salin.

-Centrifugation à 4500×g pendant 10 minutes à 4 °C

-Deux lavages, les culots ont été sélectionnés pour l'extraction de l'ADN chromosomique a été extrait par la méthode d'extraction thermique.

- L'ADNr 16S a été amplifié.

Par contre, Nika et *al.*,2018 l'ADN génomique bactérien de l'isolat a été extrait par Extraction Kit (Bioneer, Corée) selon le protocole du fabricant.

-Une paire d'amorces universelles à ARNr 16S, y compris 27F comme amorce avant (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1525R comme amorce inverse (5'-TTCCTCCACTAGGTCGG-3') ont été utilisées pour amplifier un fragment d'environ 1,5 kb de gène ARNr 16S à l'aide de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) a été réalisée dans un volume de réaction de 100 µL contenant un tampon PCR

-Après la visualisation de l'ADN amplifié par électrophorèse sur gel, un fragment d'ADN d'environ 1,4 kb a été élué à l'aide d'une d'extraction de kit sur gel QIAGEN.

-Le séquençage

-Les voisins phylogénétiques ont été déterminés par BLASTn par rapport à la base de données GenBank®

-Par conséquent, la souche SR-081 Halo a été désignée comme *Salicola marasensis* et déposée dans le NCBI avec le numéro d'accèsion KF859984.

Les volumes finales pour la PCR seuit resuiee dans le tableau si-dessous (Tab.5).

**Tableau 5.** Les éléments contenant du tompon PCR.

	(Younse et <i>al.</i> ,2011)	(Nika et <i>al.</i> ,2018)
volumes finales	50 µL	100 µL
ADN Taq polymérase	2,5 U	5,0 U
dNTP	4 mM	200 µM
les amorces	0,4 µM	1,0 µM
ADN matrice	4 ng	50 ng

Cependant, Karan et *al.*,2011 identifier de bactérie *Geomicrobium sp.* EMB2 par séquençage de l'ADNr 16S (Fig.14). l'ADN génomique de l'isolat a été extrait par Kit extraction d'échantillons PrepMan™ Ultra.(Applied Biosystems Inc., CA, États-Unis)(Fig.15).

-La pureté de l'ADN a été vérifiée par spectrophotométrie en comparant le rapport d'absorbance 260/280 nm, 260/230 nm.

-La mobilité électrophorétique sur gel d'agarose, 1473 pb a été obtenue de séquençage l'ADNr 16S.

En plus, Ozlem et *al.*,2007 identifier de *Bacillus licheniformis* souche BA17 issue extraction de l'ADN génomique.

-Analyse de la séquence de l'ADNr 16S, grâce à l'amplification du gène de l'ADNr 16S a été réalisée à l'aide des amorces oligonucléotidiques spécifiques des bactéries F27, U1492r, U517f et *E.coli* position514-529.

-L'amplification des quatre réactions PCR a été combinée et purifiée avec le système Wizard SV Gel and PCR Clean-UP.

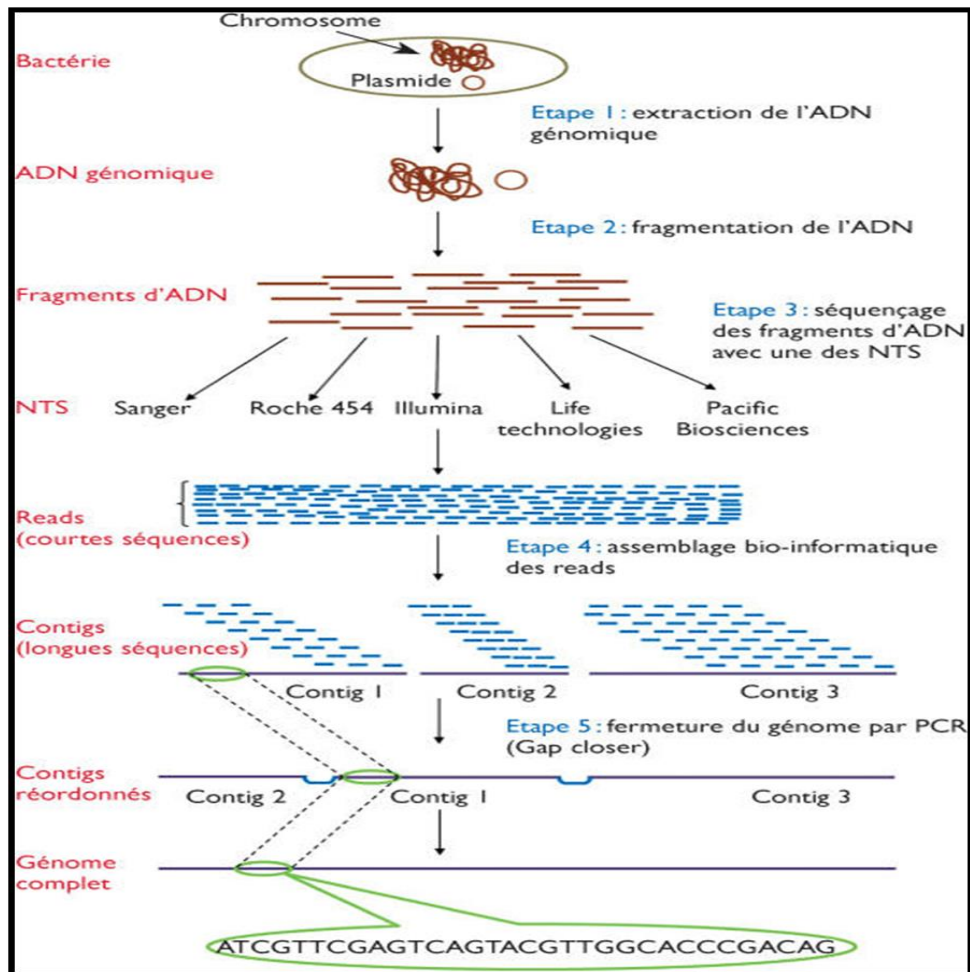
-Le séquençage de l'ADN du produit PCR purifié a été effectué dans les deux sens en utilisant une séquence automatisée par ABI-310 comptage a été effectué en utilisant SeqMan du paquet DNA Star.

-La recherche d'homologie (GenBank/EMBL/DDBJ) a été effectuée en utilisant le programme (BLAST).

-Les séquences d'ADNr 16S ont été alignées par le programme d'alignement multiple Clustal.

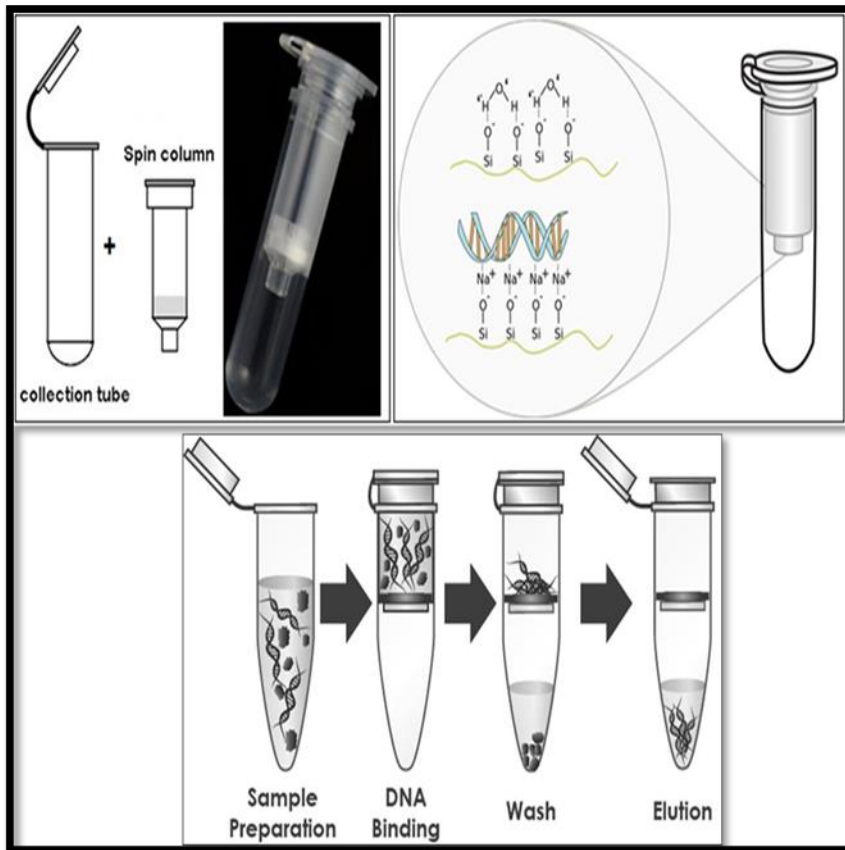
-Les analyses phylogénétiques et d'évolution moléculaire ont été réalisées à l'aide de MEGA (Fig.16).

-La séquence d'ARNr 16S de *Bacillus cereus* et de *Bacillus lentus* a été choisie comme séquence d'outgroup que permet déterminée la séquence d'ARNr 16S de la souche BA17.

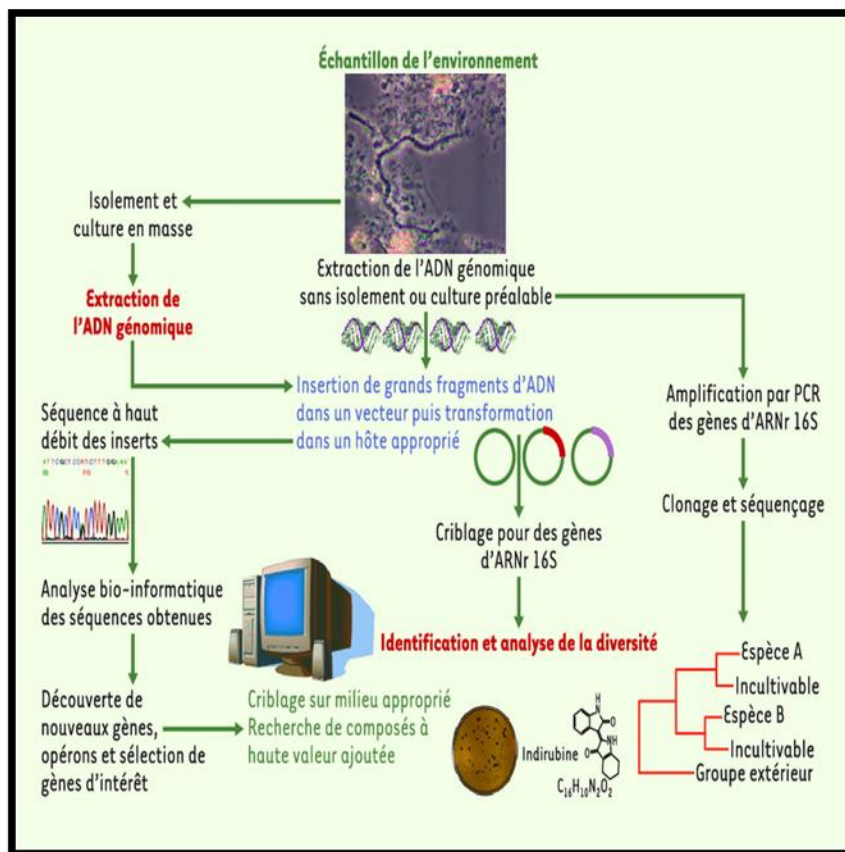


**Figure 14:** Les différentes étapes du séquençage de gène d'ADN (Sydina et *al.*,2014).





**Figure 15:** Protocol d'extraction ADN à l'aide de méthode d'extraction de Kit (Melih et *al.*, 2019).



**Figure 16:** Identification bactérienne issue extraction d'ADN génomique (Catherine et *al.*, 2005).

# **Chapitre 05 : Résultats et Discussion**

### 5.1. Isolement de bactérie productrice des protéases

Younse et *al.*, (2011) ont isolé 40 bactéries, 16 isolats (40 %) produisaient des protéases et une zone claire autour des colonies a été considérée comme l'indice de protéase.

Cependant, Karan et *al.*, (2011) au total, trente-huit (38) isolats halophiles ont été purifiés par enrichissement en sel à partir des échantillons parmi celles-ci, quatre souches identifiées, à savoir l'EMB1 (EU 621827), EMB2 (EU621828), EMB3 (EU621829) et EMB4 (EU669822).

Selon, Nika et *al.*, 2018 sur la base de la zone de clairance autour des colonies purifiées sur gélose au lait écrémé, sur 6 isolats halophiles ont été sélectionnés avec une activité protéolytique. La souche SR-081 Halo *Salicola marasensis* a montré une activité protéolytique maximale.

### 5.2. Les caractères morphologiques

Pour les articles étudiés ont montrés des différents caractères morphologiques des quelques souches bactériennes et les résultats dans le tableau suivants (Tab.6).

**Tableau 6.** Les différents caractères morphologiques des souches.

	Younse et <i>al.</i> , 2011	Karan et <i>al.</i> , 2011	Nika et <i>al.</i> , 2018	Ozlem et <i>al.</i> , 2007	Gopal et <i>al.</i> , 2007
Coloration de Gram	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif
Morphologie	ronde avec flagelle	#	ronde	#	#
Forme	#	cocci	sporulé	batonnets	Batonnets
Pigmentation	#	#	crème	#	non produits
Elevation	#	#	#	#	Convex
Bordure	#	#	#	#	Lobé

### 5.3. Les caractères biochimiques et physiologiques

(Karan et *al.*, 2011), Nika et *al.*, 2018 et Gopal et *al.*, 2007 ont fait des tests biochimiques et les résultats étaient les suivants (Tab.7).

**Tableau 7.** Les différents tests biochimiques des souches.

Tests	(Karan et <i>al.</i> ,2011)	(Nika et <i>al.</i> ,2018)	(Gopal et <i>al.</i> ,2007)
Motilité	#	Positif	Positif
Réduction de nitrate	Négatif	Positif	Négatif
VP	Négatif	Négatif	Négatif
Rouge de méthyle	#	Négatif	Positif
Production d'H <sub>2</sub> S	Négatif	Négatif	Négatif
Indol	Négatif	#	Négatif
Uréase	Négatif	Négatif	Pas produit
Test d'oxydase	Positif	Positif	Positif
Test de catalase	Positif	Positif	Positif
Glucose	#	Négatif	Positif
Galactose	#	Positif	Négatif
Fructose	#	Négatif	Positif
Saccharose	#	Négatif	Négatif
Caséine	#	Positif	Hydrolyse
Gélatine	#	Positif	Hydrolyse

#### 5.4. Analyse de séquence d'ADNr 16S

Younse et *al.*,2011 L'amplification par PCR du gène de l'ADNr 16S a révélé une seule bande de produit d'ADN amplifié de 800pb, indiquant une amplification efficace.

Les séquences d'ADN ont été publiées dans NCBI sous les numéros d'accès spécifiques.

La quantité de production de protéase (U/ml de surnageant) et les longueurs de la région de l'ADNr 16S des souches et leurs numéros d'accès spécifiques sont indiqués dans le tableau (Tab.8).

Le résultat de la PCR a été comparé à d'autres séquences bactériennes dans le NCBI. Les séquences modifiées ont été utilisées comme requêtes dans les recherches BLAST.

Parmi les 16 isolats positifs aux protéases, 11 souches (68,75 %) ont été identifiées comme des espèces de *Bacillus*, et *Bacillus sp.* BCCS 041 avait la plus grande activité protéolytique (0,43 U/ml de surnageant).

Un total de 824 nucléotides de la séquence partielle de *Bacillus sp.* BCCS 041 était similaire à 99 % aux gènes de l'ARNr 16S dans les souches enregistrées de *Bacillus subtilis* dans NCBI.

**Tableau 8.** Activité protéasique (U/ml de surnageant) et des bactéries halophiles isolées (Younse et *al.*,2011).

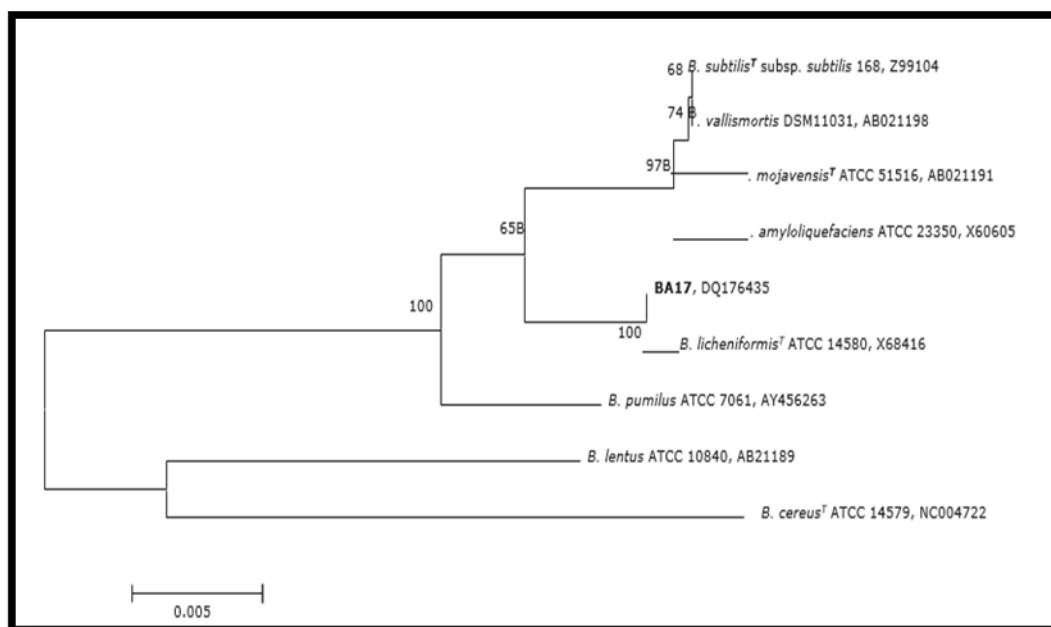
<b>Bactéries halophiles</b>	<b>Activité (U/ml)</b>
<i>Bacillus thuringiensis</i> BCCS038	0.18
<i>Paenibacillus sp.</i> BCCS042	0.19
<i>Bacillus sp.</i> BCCS 041	0.43
<i>Bacillus sp.</i> BCCS 040	0.17
<i>Aeromonas sp.</i> BCCS 037	0.39
<i>Bacillus sp.</i> BCCS 043	0.20
<i>Halobacterium sp.</i> BCCS039	0.18
<i>Halobacterium sp.</i> BCCS030	0.09
<i>Aeromonasveroni</i> BCCS025	0.07
<i>Bacillus sp.</i> BCCS 034	0.22
<i>Bacillus sp.</i> BCCS 032	0.01
<i>Bacillus sp.</i> BCCS 036	0.10
<i>Bacillus subtilis</i> BCCS027	0.07
<i>Bacillus subtilis</i> BCCS033	0.01
<i>Bacillus sp.</i> BCCS 031	0.18
<i>Bacillus subtilis</i> BCCS 028	0.17

Selon, Karan et *al.*,2011 la séquence d'ADNr 16S de *Geomicrobium sp.* 1473 pb a été obtenue à l'aide d'une kit de séquençage MicroSeq1 fullgène 16S contenant des amorces universelles (Applied Biosystems Inc., CA, USA) et l'affiliation phylogénétique a été effectuée à l'aide du système d'identification microbienne MicroSeq1 3130. L'arbre

phylogénétique a été construit par la méthode d'assemblage des voisins après avoir obtenu de multiples alignements de données disponibles auprès du National Center for Biotechnology Information (NCBI, [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

Cependant, Nika et *al.*,2018 l'analyse de la séquence d'ARNr 16S (1417pb) à été soumise à GenBank, le numéro d'accèsion KF859984 a été attribué et désignée comme *Halo salicola marasensis* SR-081.

Enfin, Ozlem et *al.*,2007 ont créer un arbre phylogénétique basé sur la comparaison des séquences d'ADNr 16S de souches de *Bacillus* de référence (Fig.17) a été construit afin de comprendre la position phylogénétique de notre souche, les analyses BLAST des 1483 bases de la séquence de l'ADNr 16S de la bactérie halotolérante *Bacillus* souche BA17 ont révélé qu'elle avait la correspondance la plus proche avec *Bacillus licheniformis* ATCC 14580T.



**Figure 17:** Arbre de jonction de voisinage montrant la position de l'isolat BA17 avec les autres membres du groupe *Bacillus subtilis* (Ozlem et *al.*,2007).

### 5.5. Cinétique de croissances et Production de protéase

Selon, Karan et *al.*,2011 la courbe de croissance de *Geomicrobium* sp. EMB2 a indiqué que la phase de latence de l'organisme a été jusqu'à six heures, après quoi la croissance a été exponentielle jusqu'à 48 heures suivie par la phase stationnaire. On a constaté que la sécrétion de protéase dépendait de la croissance et atteints le maximum en 72 heures à la phase stationnaire (Tab.9) (VoireAnnexe 6).

Nika et *al.*,2018 La croissance et l'activité protéolytique de *Salicola marasensis* est étudiées dans le milieu basal pendant 120 h. L'activité protéolytique maximale (6 U/ml) a été trouvée à 48 h de la période de fermentation, ce qui coïncide avec la croissance élevée de

l'isolat à la phase exponentielle (Tab.9) (Voire Annexe 7). La production maximale d'enzymes au début et au milieu de la phase exponentielle suggère que le contenu protéolytique extracellulaire de *S.marasensis* est produit en tant que métabolite primaire. Une diminution de l'activité enzymatique a été détectée en augmentant la période de fermentation, lorsque 4.3, 2.1, et 0.9 U/ mL ont été enregistrés à 72, 96, et 120 h de fermentation. Cette diminution pourrait être causée par l'auto-protéolyse ou la dégradation de la protéase par les autres protéases, qui ont été produites pendant la même phase de croissance.

Cependant, Gopal *et al.*,2007 ont conclu qu' la quantité maximale d'enzyme (60,0 U/ml) a été produite par la bactérie dans sa phase de croissance après 24 h d'incubation, et qu'une réduction de la production d'enzyme a été notée au-delà de cette période (Tab.9) (Voire Annexe 8), les observations montrent que la production de protéase est caractérisée par une diminution de l'activité enzymatique à la fin de la phase exponentielle de la culture de croissance. La diminution de l'activité protéasique est causée par l'arrêt de la synthèse des enzymes et par une désactivation rapide des enzymes existantes.

Le tableau suivant résume les phases de croissance les plus importants et l'activité protéolytique en fonction du temps (Tab.9).

**Tableau 9.** Les différentes phases de croissances et l'activité protéolytique en fonction de temps

	Karan <i>et al.</i> ,2011		Nika <i>et al.</i> ,2018		Gopal <i>et al.</i> ,2007	
	Activité protéolytique (U/ml)	Duré (heures)	Activité protéolytique (U/ml)	Duré (heures)	Activité protéolytique (U/ml)	Duré (heures)
Phase de latence	0.1	6	0	0	5	8
Exponentielle	22	48	5	24	52	20
Maximale	35	72	6	48	60	24
Déclin	34	78	4.3	72	9	32

Selon, Ozlem *et al.*,2007 ont étudiée La production de protéase a ont d'abord dans un milieu basal contenant différentes sources d'azote organiques et inorganiques, comme le montre le tableau 9. *Bacillus licheniformis* BA17a présenté une productivité plus élevée de protéase

alcaline dans un milieu basal contenant 0,5% d'extrait de levure et 1% de nitrate de sodium comme sources d'azote.

La production de protéase a été réduite en présence d'extrait de levure et de peptone à une concentration de 0,5 %.

La plus forte croissance a été obtenue avec une concentration de 0,25 %. la plus faible activité de protéase (0,81 U/ml) a été obtenue lorsque l'extrait de levure à une concentration de 0,5 % a été utilisé seul (Tab.10).

**Tableau 10.** Croissance et production de protéase avec différentes sources de nitrogène.

Sourced'azote	Activité protéasique(U/ml)	Biomasse (A660)
Extrait de levure 0.5%	0.81	1.72
Extrait de levure 0.25% +peptone 0.25%	3.02	2.11
Extrait de levure 0.25% +peptone 0.5%	1.95	1.64
Extrait de levure 0.5% + nitrate d'ammonium 1%	14.39	1.49
Extrait de levure 0.5% + nitrate de sodium 1%	28.53	1.61
Extrait de levure 0.5%+ sulfate d'ammonium 1%	0	1.49

Les bactéries sont influencées par plusieurs facteurs de croissance, tels que le pH, la température et la concentration en sel, qui leur permettent de produire de protéase. Les valeurs de ces facteurs varient d'une bactérie à l'autre, comme le montre le tableau 11.



**Tableau 11.** Les facteurs de croissances de chaque souche étudiées.

	(Karan et <i>al.</i> ,2011) <i>Geomicrobium</i> <i>sp.</i>	(Nika et <i>al.</i> ,2018) <i>Salicol</i> <i>a marasensis</i>	(Ozlem et <i>al.</i> ,2007) <i>Bacillus licheniformis</i>	(Gopal <i>etal.</i> ,2007) <i>Bacillus cereus</i>
concentration de NaCl % (p/v)	5	0 -30	0-20	10
pH	10	5 à 10	5.7 à 10	6 à 9
Température (°c)	50	25 à 50	30 à 40	20

## Discussion

Les résultats obtenu dans ces travaux , sur les souches bactérienne identifiés ont montre l'effet des paramètres de croissance comme : la zone d'hydrolyse,milieu de culture, nitrate réductase, oxydase et catalase, source de nitrogène, température, concentration de Na Cl, pH, la phase de croissance, ADNr 16S.

Les résultats obtenu dans ces travaux sont similaire à celle Julalak et *al.*,2016 qui a montré que *Halobacterium sp.* LBU50301 de la zone d'hydrolyse nette autour de la colonie sur la gélose au lait écrémé et gélatine, résultant la dégradation des protéines du lait dans le milieu par l'exoprotéase. Cela indique les souches étudié possèdent une activité protéolytique.

D'autre part, 38 souche *Geomicrobium sp.* On été isolétout en se basant sur les critères cités au paravant sur gélatine à la concentration NaCl (5-20%). La croissance bactérienne était supérieure qu à d'autre étude (karan et *al.*,2010) le même critère sur milieu LB. Ce résultat a montré que l'augmentation de l'activité dans la gélatine à l'induction de la production de protéase par gélatine.

Par ailleurs, les résultats de la caractérisation biochimique des isolats bactérienne a montré que le nitrate réductase, oxydase et catalase sont positif, ces résultats sont similaire au travaux de ( Gupta et *al.*,2015) sur *Halobacillus truepri* dans milieu LB.

La réduction du nitrate en nitrite ce qui indique qu'elle possède l'enzyme nitrate réductase.

Oxydase positive qui indique l'enzyme catalysant la réaction d'oxydo-réduction.

La catalase positive qui a montré qu'elle possède l'enzyme de la dégradation du peroxyde d'hydrogène.

Les résultats présentés dans le tableau 9 ont montré que la valeur la plus élevée dans (l'extrait de levure 0.5% + nitrate de sodium 1% et nitrate d'ammonium 1%) enregistrée de l'activité enzymatique de protéase du *Bacillus licheniformis* était de (28,53 U/ml ; 14,39 U/ml). Ces résultats ne sont pas cohérent à celle de (Kanekar et al., 2002) qui indiquait que l'activité de la protéase de *Bacillus alcalophilus* était dans (l'extrait de levure + peptone) 2.93 U/ml. Ce résultat peut s'expliquer que le *Bacillus licheniformis* favorise les sources d'azote organique par rapport aux sources inorganiques (Al-Khafaji, 1990).

L'effet de la température sur la production de la protéase a été déterminé en effectuant l'essai enzymatique à diverses températures allant de 20 à 50°C, a été observé que la production de protéase était optimale à 50°C, ces résultats conformes aux études antérieures (Flosade et Joshua, 2005) et (Wei-hua, 2006) qui ont montré l'augmentation la production de protéase à 50°C chez les *Bacillus sp.* Ceci est dû à une augmentation de l'énergie cinétique des molécules enzymatiques.

D'après le tableau 11 les résultats montrés que 4 souches poussent à un intervalle de 0 à 30% NaCl. La concentration 10% NaCl était optimale pour la production de protéase, ces résultats est similaire aux travaux (Suganthi et al., 2013) sur *Bacillus licheniformis*. Cela indique les souches étudiées leur nature halotolérante (Kushner, 1978) et (DasSarma, 2001).

Les résultats obtenus dans le tableau 11 qui a évalué la croissance des souches à différents pH (5 à 10), un pH optimum est 10, ces résultats sont similaire aux travaux (Fritze, 1996) (Abbas et Leila, 2011) ils confirment que *Bacillus pantothenicus* et *Bacillus sp.* sont capables de pousser à des pH 10. Cela indique que toutes les souches étudiées tolèrent des pH alcalins pour la production de protéase.

D'après les résultats obtenus l'activité maximale d'enzyme de (60,0 U/ml) a été produite par *Bacillus cereus* MTCC 6840 dans la phase de croissance après 24 h d'incubation, et qu'une réduction de la production d'enzyme a été notée à la fin de cette période, ce résultat est similaire à celui de (Wellington et Meire, 2003) était une activité maximale de (62.23 U/ml) d'enzyme *Bacillus sp.*

D'après les résultats de l'analyse ADN r 16S Pour l'identification des isolats des *Bacillus* a révélé d'ADN amplifié de ~800 bp. Ces résultats de *Bacillus sp.* 700 bp est similaire à celui de Robert et al., 2020. indiquant que une amplification efficace.

# Conclusion

## Conclusion

La diversité microbiologique due à la variation physicochimique et écologique des biotopes est une source importante d'enzymes pour les secteurs de santé, biotechnologie, industrie agroalimentaire et de génie biologique (Agrebi, 2009). Donc, les microorganismes producteurs d'enzymes protéolytiques pouvant présenter des caractéristiques innovantes et nouvelles, sont de plus en plus recherchés.

Les organismes vivant en milieux extrêmes et en particulier, les microorganismes présentent un différent des voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans ces conditions, mais aussi de se développer souvent de manière optimale.

L'objectif essentiel de ce travail était un screening de souche halophiles à partir d'échantillons dans différentes lacs salés, et aussi un screening de plusieurs activités enzymatiques de protéase a été effectué sur des diverses souches isolées.

Les identifications moléculaires des bactéries par l'amplification de PCR de gène d'ADNr 16S permet donner les séquences du ARNr des souches halophiles.

Sur le plan de la production d'enzymes, il est intéressant de signaler que parmi les souches étudiées plus que la moitié des souches possèdent des activités protéolytiques. Bien que certains paramètres ou certaines techniques prévues à effectuer n'aient pas pu être réalisées en raison de la non-exécution des travaux appliqués.

Nous comptons aussi dans l'avenir optimiser les paramètres de culture des souches afin d'améliorer leur production de biomolécules à potentiel biotechnologique important.

En plus, vu l'importance des souches sur le plan de la production d'enzymes et qui ont peut-être un potentiel biotechnologique, la purification de ces enzymes constitue une autre excellente perspective.

-La purification des enzymes protéase produites par ces souches et l'étude de leurs propriétés pour déterminer leurs domaines d'exploitation.

-L'extraction et le séquençage des gènes codant pour ces enzymes. Ils pourraient être envisagés d'améliorer et de créer des versions des séquences codantes. Pour obtenir des nouvelles expressions d'enzyme d'intérêt.

**Références  
bibliographiques**

## Liste des références

1. Abbas A.S., Leila J. 2011. Effect of Culture Conditions on the Production of an Extracellular Protease by *Bacillus sp.* Isolated from Soil Sample of Lavizan Jungle Park. SAGE-Hindawi Access to Research, 7. doi:10.4061/2011/219628.
2. Aggarwal R., Dutta T., Sheikh J. 2019. Extraction of amylase from the microorganism isolated from textile mill effluent vis a vis desizing of cotton, Sustainable Chemistry and Pharmacy, Vol. 14. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100178>.
3. Amoozegar M. A., Siroosi M., Atashgahi S., Smidt H., Ventosa A. 2017. Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. Microbiology, 163(5), 623-645.
4. Anton J., Oren A., Benlloch S., Rodriguez-Valera F., Amann R., Rosselló-Mora R. 2002. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel extreme halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. Int J Syst Evol Microbiol, vol. 1 (52), 485–491.
5. Bansode S.D. 2010. Screening of nutritional components for  $\alpha$ -amylase production in submerged fermentation by bacteria isolated from soil using Plackett-Burman design. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, vol. 2(1):93-98
6. Bhat M, Bhat S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnol Adv, vol. 15:583–620.
7. Bhat M. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnol Adv 18:355–383.
8. Bolobova A.V., Simankova M.V., Markovitch N.A., 1992. Cellulase complex of a new halophilic bacterium, *Halocella Cellulolytica*. Microbiology, vol. 61:557–562.
9. Borelle S. 2018. Enzimas protease revision importancia economica. Magazine of veterinary information, medicine and zootechnics, specialized in the poultry, pig, ruminant and aquaculture sectors.
10. Bornscheuer U.T., Kaslauskas R.J. 1999. Hydrolases in organic synthesis: regio and stereoselective biotransformations. Wiley, New York.
11. Bowman J.P., Meekin T.A. 2005. Order Alteromonadales order: Brenner. DJ, Krieg. NR, Staley. JT, Garrity. GM (eds), Bergy manual of systematic bacteriology, second edition, vol. 2 New York, 443p.

12. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M. 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edn, vol 2 (The Proteobacteria). Springer, New York. P. 1136.
13. Butt M.S., Tahir-Nadeem M., Ahmad Z., Sultan M.T. 2008. Xylanases and their applications in baking industry. *Food Technol Biotechnol* 46(1):22–31.
14. Carlos L.O., Judith S.B. 2008. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283(45):30433-30437.
15. Catherine D., Joel D., Abdelghani S. 2005. La diversité insoupçonnée du monde microbien. *Medecine sciences: M/S* vol. 21(3).
16. Charlesworth J.C., Burns B.P. 2015. Untapped resources: biotechnological potential of peptides and secondary metabolites in archaea. vol. 8:1-7. doi.org/10.1155/2015/282035.
17. Collins T., Gerday C., Feller G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. vol. 29(1):3-23.
18. D'Alessandro C.P., De Castro R.E., Giménez M.I., Paggi R.A. 2006. Effect of nutritional conditions on extracellular protease production by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. *Lett Appl Microbiol* 44: 637–642.
19. DasSarma S. 2001. Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences* : 1-9.
20. DasSarma S., DasSarma P. 2017. Halophiles. In: eLS, Wiley Ltd: Chichester, p:1-13.
21. De la Haba R.R., Sánchez-Porro C., Marquez M. C., Ventosa A. 2011. Taxonomy of halophiles, In: Horikoshi K. (ed.), *Extremophiles Handbook*, Springer. P. 1248.
22. Denger K., Warthmann R., Ludwig W., Schink B. 2002. *Anaerophaga thermohalophila* gen. nov., sp. nov., a moderately thermohalophilic, strictly anaerobic fermentative bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:173–178.
23. Dinesh K.M., Meenu S. 2015. Halophiles: Biodiversity and Sustainable Exploitation, Rajasthan, India, vol. 6, 88p.
24. Donachie S.P., Bowman J.P., Alam M. 2004. *Psychroflexus tropicus* sp. nov., an obligately halophilic *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group bacterium from an Hawaiian hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 54: 935–940.
25. Fatemeh M., Javad H., Mona D. 2015. Halophilic Bacteria: Potentials and Applications in Biotechnology. *Sustainable Development and Biodiversity*, 277p.
26. Folasade M.O., Joshua O.A. 2005. Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (8), 776-779.

27. Francisco R.V., Susana B., Rudolf A., Ramon R.M. 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* vol. 52(2):485-491.
28. Franzmann P.D., Wehmeyer U., Stackebrandt E. 1988. *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class Proteobacteria to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*. *Syst Appl Microbiol* 11:16-19.
29. Fritze D. 1996. *Bacillus haloalkaliphilus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 98 -101.
30. Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T. 2005. Phylum XIV Proteobacteria phyl nov. In: Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2, 2nd edn, (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria). Springer, New York: 1.
31. Garrity G.M., Holt J.G. 2001. Taxonomic outline of the archaea and bacteria. In: Boone D.R., Castenholz R.W (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1, 2nd edn, The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria. Springer, New York: Pp. 155-166.
32. Gauthier M.J., Lafay B., Christen R., Fernandez L., Acquaviva M., Bonin P., Bertrand J.C. 1992. gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 42: 568-576.
33. Gopal K.J., Sarvesh K., Vinay S. 2007. Production of moderately halotolerant, SDS stable alkaline protease from *Bacillus cerus* MTCC6840 isolated from lake Nainital, Uttaranchal state India. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 38:773-779.
34. Govender L., Naidoo L., Setati M.E. 2009. Isolation of hydrolase producing bacteria from Sua pan solar salterns and the production of endo-1, 4- $\beta$ -xylanase from a newly isolated haloalkaliphilic *Nesterenkonia* sp. *Afr J Biotechnol* 8: 5458-5466.
35. Greenberg E.P., Canale-Parola E. 1976. *Spirochaeta halophila* sp. nov. a facultative anaerobe from a high-salinity pond. *Arch Microbiol* 110: 185-194.
36. Gübitz G., Haltrich D., Latal B., Steiner W. 1997. Mode of depolymerisation of hemicellulose by various mannanases and xylanases in relation to their ability to bleach softwood pulp. *Appl Microbiol Biotechnol* 47(6):658-662.
37. Guo B., Chen X.L., Sun C.Y., Zhou B.C., Zhang Y.Z. 2009. Gene cloning, expression and characterization of a new cold-active and salt-tolerant endo- $\beta$ -xylanase from marine *Glaciecola mesophila* KMM 241. *Appl Microbiol Biotechnol* 84: 1107-1115.
38. Gupta R., Beg Q. K., Lorenz P, 2002. "Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications," *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 59, no. 1, 15-32.



39. Gupta S., Parul S., Kamal D., Malay S., Anuradha S. 2015. A diverse group of halophilic bacteria exist in Lunsu, a natural salt water body of Himachal Pradesh, India, Springer Plus, Vol. 4, 274 DOI 10.1186/s40064-015-1028-1.
40. Ivanova E.P., Mikhailov V.V. (2001). A new family, Alteromonadaceae fam. nov., including marine proteobacteria of the genera *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Idiomarina* and *Colwellia*. *Mikrobiologiya* 70:15–23.
41. Jaeger K.E, Eggert T. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, Vol. 13: 390–397.
42. Julalak C., Preeyanuch B., Mehraj A., Duangporn K., Sawitree D. 2016. Approach toward enhancement of halophilic protease production by *Halobacterium sp.* strain LBU50301 using statistical design response surface methodology. *Biotechnology reort*, Vol. 10, 17-28.
43. Kathiresan K., Manivannan S. 2006. “ $\alpha$ -Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 5, no. 10, pp. 829-832.
44. Kanekar P.P., Nilegaonkar S.S., Sarnaik S.S., Kelkar A.S. 2002. Optimization of protease activity of alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline lake in India, *Bioresource Technology* 87-93p.
45. Karami A., Hosseini S.M., Kiarudi Y. 2007. Molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* linear plasmids by DNA hybridization, PCR, two-dimensional gel electrophoresis, and electron microscopy. *Turk J Biol* 31(2):73.
46. Karami A., Sarshar M., Ranjbar R., Zanjani R.S. 2014. The Phylum Spirochaetaceae. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2\\_156](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_156).
47. Karan R., Singh S.P., Sanjay K., Khare S.K. 2011. A novel organic solvent tolerant protease from a newly isolated *Geomicrobium sp.* EMB2 (MTCC 10310): production optimization by response surface methodology. *New Biotechnology*. Vol. 28.
48. Karan R., Singh S.P., Sanjay K., Khare S.K. 2010. A novel organic solvent tolerant protease from a newly isolated *Geomicrobium sp.* EMB2 (MTCC 10310): production optimization by response surface methodology. *New Biotechnology*, Vol. 28.
49. Karnchanatat A., Petsom A., Sangvanich P., Piapukiew J., Whalley A.J., Reynolds C.D., Gadd G.M., Sihanonth P. 2008. A novel thermostable endoglucanase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.: Fr.) Rehm. *Enzym Microb Technol*, Vol. 42:404–413.

50. Khallef S. 2019. Etude de la flore bactérienne halophile cultivable des zones humides de Ouargla (Algérie). Thèse de Doctorat en Microbiologie Appliquée, Université Mouloud Mammeri de TIZI-OUZOU, 38-39p.
51. Khandeparker R., Numan M.T. 2008. Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology. *Ind J Microbiol Biotechnol* 35(7):635–644.
52. Kharroub K., Aguilera M., Quesada T., Morillo A.J., Ramos-Cormenzana A., Boulharouf A., Monteoliva-Sánchez M. 2006. *Salicola salis* sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from Ezzemoul sabkha in Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2647–2652.
53. Kumar C.G., Takegi H. 1999. Microbial Alkaline Proteases: From a Bioindustrial Viewpoint. *Biotechnol. Adv*, Vol. 17:561–594.
54. Kumar C.G., Joo H.S., Koo Y.M., Paik S.R., Chang C.S. 2004. Thermostable alkaline protease from a novel marine haloalkaliphilic *Bacillus clausii* isolate. *World J Microbiol Biotechnol* 20:351–357. doi:10.1023/B:WIBI.0000033057.28828.a7.
55. Kumar S., Karan R., Kapoor S., Singh S. P., Khare S. K. 2012. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1595-1603.
56. Kushner D.J. 1978. Life in high salt and solute concentrations: Halophilic bacteria. In Kushner D. J. (Ed.), *Microbial life in extreme environments*. Academic Press.
57. Lama L., Romano I., Calandrelli V., Nicolaus B., Gambacorta A. 2005. Purification and characterization of a protease produced by an aerobic haloalkaliphilic species belonging to the *Salinivibrio* genus. *Res Microbiol* 156:478–484. doi:10.1016/j.resmic.2004. 12.004.
58. Larsen H. 1962. Halophilism. In *The Bacteria: a treatise on structure and function*. Volume IV. Eds. I. C. Gunsalus & R. Y. Stanier. pp. 297-342. Academic Press Inc, New York.
59. Li Q., Chen X., Jiang Y., Jiang C. 2016. Morphological Identification of Actinobacteria. In: *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*, IntechOpen, London, 59-86. <https://doi.org/10.5772/61461>.
60. Litchfield C. D. 2011. Potential for industrial products from the halophilic Archaea. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(10), 1635-1647.
61. Ludwig W., Klenk H.P. 2001. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In: Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M (edn) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1, 2nd edn. Springer, New York. Pp. 49–65.
62. Ludwig W., Schleifer K.H., Whitman W.B. 2008. Revised road map to the phylum Firmicutes. In: de Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey

- F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 3, 2nd edn, The firmicutes. Springer, New York. Pp. 1–13.
63. Madhavi J., Srilakshmi J., Raghavendra M.V. Sambasiva R. 2011. Efficient Leather Dehairing by Bacterial Thermostable Protease. International Journal of Bio-Science and Bio-Technology, vol.3, No. 4.
64. Madigan M.T., Martinko J.M. 2007. Brock Biology of Microorganisms, 11th edition. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
65. Makhdoumi-Kakhki A., Amoozegar M.A., Ventosa A. 2012. *Salinibacter iranicus* sp. nov. and *Salinibacter luteus* sp. nov., isolated from a salt lake, and emended descriptions of the genus *Salinibacter* and *Salinibacter ruber* : 1-26.
66. Maturrano L., Valens-Vadell M., Rosselló-Mora R., Antón J. 2006. *Salicola marasensis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from the Maras solar salterns in Peru. Int J Syst Evol Microbiol 56: 1685–1691.
67. Melih B.A., Ozge G., Yucel S. 2019. Molybdenum blue production method in high performance and solid state. Chemistry.
68. Mohsen M.D., Fahimeh A. 2013. Application of alpha-amylase in biotechnology. Journal of biology and today's world, Vol. 1, no. 1, 39-50.
69. Moreno M.D.L., Garcia M.T., Ventosa A., Mellado E. 2009. Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase- and protease-producing extreme halophile. FEMS Microbiol Ecol 68: 59-71.
70. Nedashkovskaya O.I., Kim S.B., Lysenko A.M., Frolova G.M., Mikhailov V.V., Bae K.S., Lee D.H., Kim I.S. 2005. *Gramella echinicola* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. Int J Syst Evol Microbiol 55:391–394.
71. Nika K., Shahla R., Amene S.N., Mohsen A., Mahsa M., Mohammad R. K., Mohammad A.F. 2018. Enhanced Production and Characterization of a Highly Stable Extracellular Protease from an Extreme Halophilic Isolate *Salicola Marasensis*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, vol.17(4):1392-1412.
72. Nordberg P., Hofsten V.B. 1969. Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. J Gen Microbiol 55: 251-256.
73. Oren A. 2010. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. Environmental Technology 31: 8–9, 825–834.
74. Oren A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. Saline Systems, 4:2.

75. Oren A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 56-63.
76. Oren A. 2006. Halophilic microorganisms and their environments (Vol. 5). Springer Science and Business Media. 575p.
77. Oren A. 2011. Diversity of halophiles. *Extremophiles handbook*, 309-325.
78. Özlem A., Ebru T.O., Burhan A., Aziz A.D., Dilek K. 2007. Isolation and identification of alkaline protease producer halotolerant *Bacillus licheniformis* strain BA17. *Annals of Microbiology*, vol. 57 (3) 369-375.
79. Pandey A., Nigam P., Soccol C.R., Soccol V.T., Singh D., Mohan R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem*, 31(Pt 2):135–152.
80. Parsiegla G., Belaich A., Belaich J.P., Haser R. 2002. Crystal Structure of the cellulase CEL9M of *C. Cellulolyticum* in complex with cellobiose. *Biochemistry*, vol. 41: 11134-11142.
81. Prakash S., Veeranagouga Y., Kyoung L., Sreeramulu K. 2009. Xylanase production using inexpensive agricultural wastes and its partial characterization from a halophilic *Chromohalobacter* sp. TPSV101. *Process Biochem* 25: 197-204.
82. Quesada E., Béjar V., Ferrer M.R., Calvo C., Llamas I., Martínez-Checa F. 2004. Moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacteria. In *Halophilic microorganisms*. Springer, Berlin, Heidelberg. 297-314.
83. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998;62:597–635.
84. Reddy C.S.K., Ghai R., Rashmi K.V.C. 2003. *Bioresour. Technol* , Vol. 87, 137–146.
85. Robert R., Ioana G., Octavian P., Roxana C., Simona N., Ioana L., Costin B., Madalin E. 2020. Bioprospecting for Novel Halophilic and Halotolerant Sources of Hydrolytic Enzymes in Brackish, Saline and Hypersaline Lakes of Romania. *Microorganisms*, vol. 8, no. 12.
86. Rodriguez-Valera .F. 1993. Introduction to Saline Environments. In *The Biology of Halophilic Bacteria*. Eds. R. H. Vreeland & L. I. Hochstein. pp.1-23. CRC Press Inc, Boca Raton.
87. Sánchez-Porro C., Mellado E., Bertoldo C., Antranikian G., Ventosa A . 2003. Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76. *Extremophiles* 7:221–228.
88. Schmid R.D., Verger R. 1998. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chem Int Ed* 37:1608–1633.

89. Setati M.E .2009. Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria. *Afr J Biotechnol* 9 (11): 1555-1560.
90. Sydina M.D., Claire B., Trestan P., Jacques S., Gilbert G.2014. Génomique et métagénomique bactériennes : applications cliniques et importance médicale. *Microbiologie clinique, Rev Med Suisse*, vol. 0, no. 450, 2155-2161.
91. Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C. 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotech Adv* 19:627–662.
92. Shivanand P., Mugeraya G.2011. Halophilic bacteria and their compatible solutes–osmoregulation and potential applications. *Current Science*, 100(1), 1516-1521.
93. Sorokin D.Y., Tourova T.P., Galinski E.A., Belloch C., Tindall B.J. 2006. Extremely halophilic denitrifying bacteria from hypersaline inland lakes, *Halovibrio denitrificans* sp. nov. and *Halospina denitrificans* gen. nov., sp. nov., and evidence that the genus name *Halovibrio* Fendrich with the type species *Halovibrio variabilis* should be associated with DSM 3050. *Int J Syst Evol Microbiol*, Vol. 56: 379–388.
94. Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol* 47:79–491.
95. Suganthi C., Mageswari A., Karthikeyan S., Anbalagan M., Sivakumar A., Gothandam K.M.2013. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, Vol. 11, 47-51.
96. Taha M.2020. Biodiversité microbienne dans les milieux extrêmes salés du Nord-Est Algérien. Thèse de Doctorat en Microbiologie Appliquée , Université Mustapha Ben Boulaïd-Batna 2-9 p.
97. Tan K., Sather A., Cobb G., Joachimiak A.2008. The crystal structure of a Lipase-esterase related protein from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. vol 1.1.
98. Vaisman N., Oren A. 2009. *Salisaeta longa* gen. nov., sp. nov., a red, halophilic member of the Bacteroidetes. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2571–2574.
99. Ventosa A., Nieto J.J.1995. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol* 11:85–94.
100. Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. 1998. Biology of aerobic moderately halophilic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 504–544.
101. Verger R.1997. Interfacial Activation of Lipases: Facts and Artifacts. *Trends in Biotechnology*, 15, 32-38. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(96\)10064-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(96)10064-0).

102. Wei H. 2006. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 34(3):241.
103. Wellington C. A. N, Meire L. L .M.2003. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus sp.* *Brazilian Journal of Microbiology*. 35:91-96.
104. Windish W.W., Mhatre N.S.1965. Microbial amylases. In: Wayne WU, editor. *Advances in applied microbiology*, vol. 7. New York: Academic Press:273/304.
105. Yan S.,Wu G.2013.Secretory pathway of cellulase: a mini-review. *Biotechnol Biofuels* 6, 177. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-177>.
106. Younes G, Sara R.A, Alireza E, Aboozar K, Maryam S, Najme T.2011.Screening and Isolation of Extracellular Protease Producing Bacteria from the Maharloo Salt Lake,Iranian *Journal of Pharmaceutical Sciences*,Vol. 7(3): 175-180.
107. Zhang G., Li S., Xue Y., Mao L., Ma Y. 2012.Effects of salts on activity of halophilic cellulase with glucomannanase activity isolated from alkaliphilic and halophilic *Bacillus* sp. BG-CS10. *Extremophiles* 16:35–43 *FEMS Microbiol Rev*, Vol. 29:3–23.
108. Zhi X.Y., Li W.J., Stackebrandt E. 2009.An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 589–608.
109. Zhilina T.N., Zavarzin G.A., Rainey F., Kevrim V.V., Kostrikina N.A., Lysenko A.M. 1996. *Spirochaeta alkalica sp. nov.*, *Spirochaeta africana sp. nov.*, and *Spirochaeta asiatica sp. nov.*, alkaliphilic anaerobes from the continental soda lakes in Central Asia and the East African Rift. *Int J Syst Evol Microbiol*, Vol. 46: 305–312.

## Site web

Site web 1: <https://rsis.ramsar.org/>.

# **Annexes**

## Annexes

### Annexe 1

**Tableau.** Compositions dans milieu gélosé saliné.

lait écrémé	tryptone	NaCl
2% (p/v)	1% (p/v)	7% (p/v)

### Annexe 2.

**Tableau.** Différentes compositions dans bouillon nutritif.

glucose	peptone	extrait de levure	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaCl
10 ( g/l)	5( g/l)	5( g/l)	5( g/l)	100-200( g/l)

### Annexe 3.

**Tableau.** Différentes compositions dans milieu d'agar

extrait de levure	peptone	agar	NaCl
5( g/l)	10( g/l)	15( g/l)	#

### Annexe 4.

**Tableau.** Différentes compositions dans milieu de croissance.

extrait de levure	peptone	agar	NaCl	NaNO <sub>3</sub>
1( g/l)	10( g/l)	20( g/l)	100( g/l)	2( g/l)

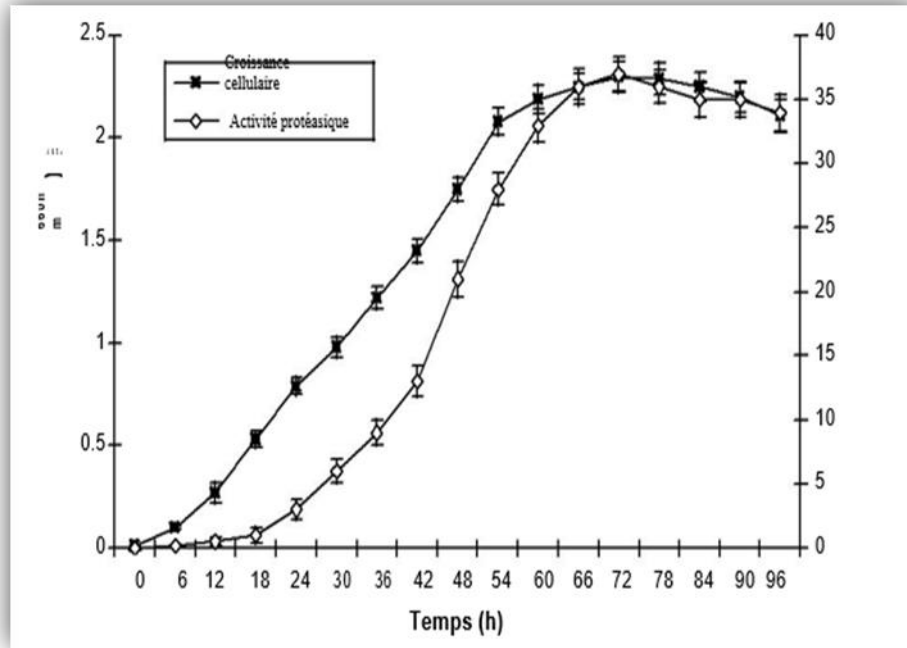
### Annexe 5.

**Tableau.** Différentes compositions dans milieu d'agar.

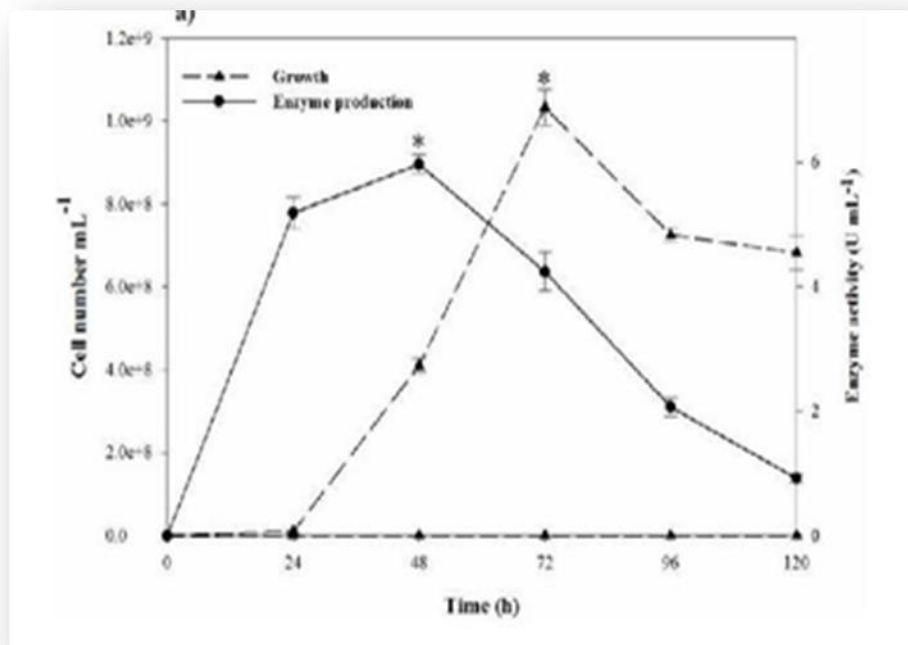
peptone	NaNO <sub>3</sub>	lait écrémé	lactose	ZnSO <sub>4</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> )NO
20	2,5	10	5	1,25	2	2,5



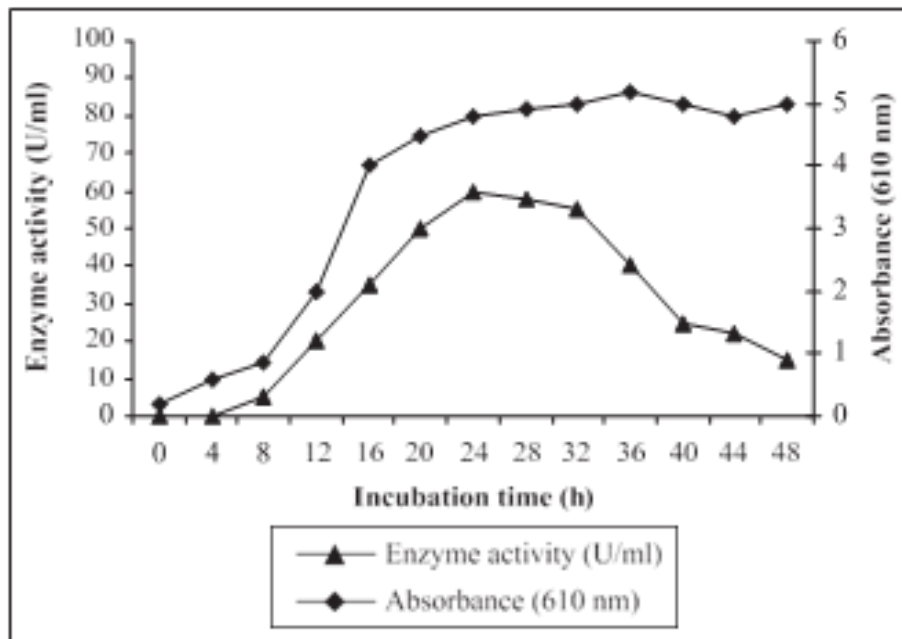
### Annexe 6. Cinétique de croissance de *Geomicrobium* sp. EMB2



### Annexe 7. Comportement de croissance de *S. marasensis* et son profil de production de protéases kératinolytiques.



**Annexe 8.** Production de protéase par *B. cereus* MTCC 6840 à différents intervalles de croissance.



## ملخص

الغرض من هذا العمل هو عزل السلالات البكتيرية الهالوفيلية القادرة على إنتاج البروتينات التي تم عزلها من مختلف بحيرات الملح

في. *Geomicrobium sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus sp.*, *Salicola marasensis*, *Bacillus cereus*.

كما تمت دراسة عوامل مختلفة تؤثر على إنتاج البروتين ونشاطه لتحسين الزراعة الإنزيمية، حيث تم العثور على درجة الحرارة المثلى

لالنشاط الإنزيمي عند 50-55 درجة مئوية، بينما تراوحت درجة الحموضة من 5-10 و نترات الصوديوم والأمونيوم كمصدر للنيتروجين % 30. وتركيز

الملح 30

الكلمات المفتاحية : بروتياز، بكتيريا هالوفيلية، بحيرات مالحة

، *Geomicrobium sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus. Sp.*, *Salicola marasensis*, *Bacillus cereus*.

## Résumé

Le but de ce travail est d'isoler les souches bactériennes halophiles capables de produire une protéase qui ont été isolées de divers lacs salés parmi ces souches *Geomicrobium sp.*, *Bacillus licheniformis.*, *Bacillus sp.*, *Salicola marasensis*, *Bacillus cereus*.

Les différents facteurs affectant la production et l'activité de la protéase ont également été étudiés afin d'optimiser pour un meilleur rendement enzymatique, où il a été trouvé que la température optimale de l'activité enzymatique 50-55°C, tandis que le pH varie de 5-10 et NaCl à 30%, nitrate de sodium et ammonium comme source de nitrogène.

**Mots clés :** protéase, bactéries halophiles, *Geomicrobium sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus. Sp.*, *Salicola marasensis*, *Bacillus cereus*, lacs salés.

## Abstract

The aim of this work is to isolate the halophilic bacterial strains capable of producing protease which were isolated from various salt lakes among these strains *Geomicrobium sp.*, *Bacillus licheniformis.*, *Bacillus sp.*, *Salicola marasensis*, *Bacillus cereus*.

The different factors affecting the production and activity of the protease were also studied in order to optimize for a better enzymatic yield, where it was found that the optimal temperature of the enzymatic activity 50-55°C, while the pH varies from 5-10 and NaCl to 30%, sodium nitrate and ammonium as nitrogen source.

**Key words:** protease, halophilic bacteria, *Geomicrobium sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus. Sp.*, *Salicola marasensis*, *Bacillus cereus*, salt lakes.