



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique

Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen
Faculté des sciences de la nature et de la vie
et des sciences de la terre et de l'univers
Département de Biologie
Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire,
au Biomédical et à l'Environnement



Mémoire

Présenté par

M^{elle} RIAHI Kawther Nor El Houda

M^{elle} SEGHIR Mokhtaria

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie et Contrôle de Qualité

Thème

**Recherche de la production des enzymes utilisées
en bioremédiation par une bactérie extrêmophile**

Soutenu le **23/06/ 2026**

Devant le jury composé de :

President	Mr. REBIAHI Sid Ahmed	Pr. Université de Tlemcen-Algérie
Encadrante	Mme NAS Fatima ep. RABEHI	M.C.B. Université de Tlemcen-Algérie
Examinatrice	Mme GAOUAR Sara	M.C.B. Université de Tlemcen-Algérie

Année universitaire 2025-2026

Remerciement

Avant tout, nous tenons à remercier ALLAH, le Tout-Puissant et le Miséricordieux, qui nous a accordé la force, la patience et le courage nécessaires pour mener à bien ce modeste travail.

Ce mémoire est le fruit d'un long parcours enrichissant, au cours duquel nous avons eu la chance de bénéficier des conseils et du soutien inestimable de plusieurs personnes.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude aux membres du jury :

- ❖ **Mr. REBIAHI Sid Ahmed**, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen qui a accepté de présider ce jury, qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance.
- ❖ **Mme GAOUAR SARA** Maitre de Conférence B. à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen qui a accepté de juger ce travail. Nous sommes particulièrement honorées de bénéficier de vos remarques.

Un grand merci à notre promotrice, **Mme NAS Fatima**, Maitre de Conférence B. à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen. Nous la remercions chaleureusement pour avoir proposé ce sujet captivant, ainsi que pour sa disponibilité constante, sa bienveillance et ses conseils avisés tout au long de cette recherche. Ce fut un réel honneur de travailler sous sa direction.

Nous tenons à remercier tous nos enseignants et tous les membres du laboratoire de «Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, Au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) - Université de Tlemcen » pour l'aide précieuse, le soutien et les conseils dans les moments difficiles.

Nos pensées et nos remerciements vont également à nos petites familles, nos chers amis et nos collègues, qui ont toujours cru en nous et nous ont encouragés sans relâche jusqu'aux derniers instants de ce travail.

Enfin, les mots nous manquent pour exprimer toute notre gratitude et notre tendresse envers **nos parents**. Sans leur amour inconditionnel, leurs prières quotidiennes et leur soutien indéfectible, ce travail n'aurait jamais pu voir le jour. Que ce mémoire soit le témoignage de notre profonde reconnaissance.

Dédicace

Bismi Allahi Ar-Rahmani Ar-Rahimi

hamdou lillahi rabbi al-'alamin, qui m'a accordé la santé, la patience et la force pour mener à bien ce travail. Je Le remercie pour Ses bienfaits innombrables et pour m'avoir guidée tout au long de ce parcours.

Je dédie le fruit de ce modeste travail :

À mon cher père : source de ma force et de ma fierté, qui n'a jamais cessé de me soutenir, de me conseiller et de m'encourager, ton amour et ta patience ont toujours été une source de motivation et de persévérance pour moi. Que Dieu le protège et le comble de Ses bienfaits.

À ma chère mère : symbole d'amour, de tendresse et de dévouement, qui a tant sacrifié pour mon bonheur et ma réussite. Aucun mot ne saurait exprimer toute ma gratitude et mon affection envers elle.

À mes chères sœurs : Aychouch et fatima zohra, pour leur amour sincère, leur présence et leur soutien constant tout au long de mon parcours, je vous aime beaucoup.

À mon cher mari : pour ça patience et sa confiance en moi, ses encouragements constants et son soutien indéfectible dans les moments les plus difficiles À celui qui partagé mes rêves, merci d'avoir été une partie belle et essentielle de cette expérience et de cette réussite

À mes chères amies : pour les merveilleux souvenirs partagés, leur amitié sincère et leur soutien précieux durant toutes ces années.

À ma chère encadrante : pour sa disponibilité, ses précieux conseils, son accompagnement et son soutien tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Enfin, à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail :

Je vous dédie ce mémoire avec toute mon affection, ma reconnaissance et mon profond respect

Mokhtaria

Dédicace

À Dieu le Tout-Puissant

Je remercie Dieu de m'avoir accordé la force, la patience et la volonté d'accomplir ce travail. Ma gratitude est infinie pour Ses innombrables bienfaits et pour avoir guidé mes pas sur le chemin du savoir.

À moi-même

À celle qui n'a jamais abandonné, qui a cru en ses rêves malgré les nuits de fatigue et les moments de doute. Je dédie ce succès à ma propre persévérance, en hommage à chaque effort fourni pour atteindre ce but.

À ma chère mère

Ma source infinie d'amour. Aucun mot ne saurait exprimer ma gratitude pour tes sacrifices et ton soutien inconditionnel. Tu es mon pilier et ma source d'inspiration. Ce succès est le fruit de tes prières et de ton amour infini.

À mon cher père

Pilier fondamental de ma vie, symbole de force, de courage et de persévérance. Merci pour tes sacrifices, ton soutien indéfectible et les valeurs que tu m'as inculquées, qui ont guidé chacun de mes pas.

À mes frères et ma sœur

Merci pour votre présence constante à mes côtés. Vous avez partagé mes inquiétudes comme mes joies, et m'avez encouragée tout au long de ce parcours. Vous êtes ma force et ma fierté.

À mon fiancé

Merci de croire en moi, de m'encourager sans cesse et de partager cette belle aventure. Ce travail est aussi le tien. Que cet accomplissement soit le premier d'une longue série à tes côtés.

À Madame NAS Fatima

Merci pour votre accompagnement bienveillant, vos conseils précieux et votre disponibilité tout au long de ce travail.

À toutes celles et ceux qui m'ont soutenue d'une manière ou d'une autre,
Merci du fond du cœur

KANTHER

Table des matières

ملخص

Abstract

Résumé

Liste des Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction général..... 1

Synthèse bibliographique

1. Les microorganismes extrémophiles..... 3

1.1. Définition 3

1.2. Les classes des microorganismes extrémophiles..... 3

2. Les microorganismes des habitats salins et hypersalins..... 4

3. Application des microorganismes halophiles et halotolérants en bioremédiation..... 6

4. Principales enzymes microbiennes utilisés en bioremédiation 6

4. 1. Les hydrolases..... 6

4. 2. Cytochromes P450..... 7

4. 3. Les laccases..... 7

4. 4. Les déhalogénases..... 8

5. Autres applications biotechnologiques des microorganismes halophiles et halotolérants 8

Matériel et méthodes

1. Origine de la souche LMB3057..... 10

2. Revivification et vérification de la pureté de la souche 10

3. Caractérisation phénotypique de la souche LMB3057..... 10

3. 1. Détermination des caractères microscopiques 10

3. 2. Caractères macroscopiques 10

3. 3. Croissance à différentes conditions de température, pH et salinité..... 11

3. 4. Caractères biochimiques..... 11

3. 4. 1. Recherche de la catalase..... 11

3. 4. 2. Recherche de la Cytochrome-oxydase..... 11

3. 4. 3. La galerie API 20 E..... 11

4. Mise en évidence du potentiel biotechnologique de l'isolat LMB3057 12

4. 1. Recherche de la production des enzymes extracellulaires sur milieu gélosé	12
4. 1. 1. Recherche de l'amylase.....	12
4. 1. 2. Recherche de la cellulase.....	12
4. 1. 3. Recherche de la caséinase.....	12
4. 1. 4. Recherche des estérases.....	12
4. 1. 4. 1. Hydrolyse du Tween 80.....	12
4. 1. 4. 2. Recherche de la lécithinase.....	13
4. 1. 4. 3. Recherche de la lipase.....	13
4. 2. Essai d'application biotechnologique en présence de polluants.....	13
4. 2. 1. Criblage primaire de la biodégradation des colorants sur milieu solide	13
4. 2. 2. Test de croissances sur le carburant Diesel.....	13
Résultats et discussion	
1. Résultats.....	14
1. 1. Caractérisation phénotypique de l'isolat LMB3057.....	14
1. 1. 1. Caractérisation microscopique	14
1. 1. 2. Caractérisation macroscopique.....	14
1. 1. 3. Caractérisation physiologique.....	15
1. 1. 4. Caractérisation biochimique	15
1. 2. Mise en évidence du potentiel biotechnologique de l'isolat LMB3057.....	16
1. 2. 1. Screening des activités enzymatiques extracellulaires	16
1. 2. 2. Criblage primaire de la biodégradation des colorants sur milieu solide	17
1. 2. 3. Test de la croissance sur carburant Diesel	18
2. Discussion	19
Conclusion et perspectives.....	23
Références bibliographiques.....	26
Annexe.....	32

ملخص

يمثل التلوث البيئي الناتج عن الأنشطة الصناعية والزراعية والحضرية إحدى المشكلات الرئيسية في الوقت الحاضر، وذلك بسبب تراكم العديد من الملوثات المستديمة، ولا سيما الهيدروكربونات والأصبغ الاصطناعية. وفي هذا السياق، تبرز المعالجة الحيوية كبديل بيئي ومستدام يعتمد على استخدام الكائنات الحية الدقيقة القادرة على تفكيك هذه الملوثات. هدفت هذه الدراسة إلى البحث عن إنتاج الإنزيمات المشاركة في عمليات المعالجة الحيوية لدى سلالة بكتيرية محبة للظروف القاسية تحمل الرمز LMB3057، تم تحديدها على أنها تنتمي إلى جنس *Bacillus*، وعُزلت من مياه السبخة الكبرى لوهران.

خضعت السلالة المعزولة للتوصيف الظاهري، حيث تبين أنها عصوية الشكل، موجبة لصبغة غرام، متحركة، وتُظهر نشاط إنزيمي الكاتالاز والأوكسيداز. كما أظهرت API 20E نمطاً أيضاً متنوعاً. وأوضحت الدراسة الفسيولوجية أن السلالة تتمتع بقدرة كبيرة على تحمل الظروف البيئية القاسية، إذ لوحظ نموها عند تراكيز من كلوريد الصوديوم تراوحت بين 0 و25٪، ودرجات حرارة تتراوح بين 25 و60 درجة مئوية، وقيم pH تتراوح بين 6 و9. وأظهر تقييم الإمكانيات الإنزيمية للسلالة امتلاكها رصيذاً إنزيمياً واعداءً، حيث أنتجت إنزيمات الأميلاز، والسيليولاز، والكازيناز، والإستيراز، والليسيثيناز، والليباز. وقد سُجلت هذه الأنشطة الإنزيمية سواء في غياب الملح أو في وجود تراكيز مرتفعة منه.

كما بينت اختبارات المعالجة الحيوية قدرة السلالة LMB3057 على إزالة لون بعض الأصباغ الاصطناعية، خاصة أزرق الميثيلين وأحمر الكونغو. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت السلالة قدرة على النمو في وسط يحتوي على الديزل كمصدر وحيد للكربون والطاقة، مما يشير إلى قدرتها المحتملة على تحلل بعض الهيدروكربونات. وبناءً على هذه النتائج، يمكن اعتبار هذه السلالة والإنزيمات التي تنتجها مرشحين واعدين للعديد من التطبيقات البيوتكنولوجية.

الكلمات المفتاحية: الكائنات المحبة للظروف القاسية، الإنزيمات المتطرفة، المعالجة الحيوية، الأصباغ الاصطناعية، الديزل.

Abstract

Environmental pollution resulted by industrial, agricultural, and urban activities has become a major concern due to the accumulation of persistent pollutants, particularly hydrocarbons and synthetic dyes. In this context, bioremediation has gained increasing attention as an environmentally sustainable strategy that employs microorganisms capable of degrading these contaminants.

The present study aimed to investigate the production of enzymes involved in bioremediation by an extremophilic bacterial strain designated LMB3057, identified as belonging to the genus *Bacillus* and isolated from the waters of the Great Sebkha of Oran.

The isolate was subjected to phenotypic characterization. It was found to be a Gram-positive, motile rod exhibiting both catalase and oxidase activities. The API 20E system revealed a diversified metabolic profile. The physiological characterization demonstrated that the strain exhibits a broad tolerance to extreme environmental conditions, with growth occurring at NaCl concentrations ranging from 0 to 25%, temperatures between 25 and 60°C, and pH values ranging from 6 to 9.

The evaluation of its enzymatic potential revealed a promising enzymatic repertoire. The isolate produced amylase, cellulase, caseinase, esterase, lecithinase, and lipase. These enzymatic activities were observed both in the absence and presence of high salt concentrations.

Furthermore, bioremediation assays demonstrated the ability of strain LMB3057 to decolorize certain synthetic dyes, particularly methylene blue and Congo red. The strain also showed the ability to grow in a medium containing diesel as the sole source of carbon and energy, suggesting its potential capability to degrade certain hydrocarbons.

This isolate and its enzymes may therefore represent promising candidates for various biotechnological applications.

Keywords : Extremophiles; extremoenzymes; bioremediation; synthetic dyes; diesel.

Résumé

La pollution environnementale issue des activités industrielles, agricoles et urbaines constitue aujourd'hui une problématique majeure en raison de l'accumulation de nombreux polluants persistants, notamment les hydrocarbures et les colorants synthétiques. Dans ce contexte, la bioremédiation apparaît comme une alternative écologique et durable reposant sur l'utilisation de microorganismes capables de dégrader ces contaminants. Le présent travail vise à rechercher la production d'enzymes impliquées dans la bioremédiation chez une souche bactérienne extrêmophile, désignée LMB3057 et identifiée comme appartenant au genre *Bacillus*, isolée à partir des eaux de la Grande Sebkhah d'Oran.

L'isolat a été soumis à une caractérisation phénotypique. Il se présente sous forme de bâtonnet à Gram positif, mobile, et possédant une catalase et oxydase. La galerie API 20E a révélé un métabolisme diversifié. L'étude des paramètres physiologiques a montré que la souche présente une large tolérance aux conditions environnementales extrêmes, avec une croissance observée à des concentrations en NaCl comprises entre 0 et 25 %, des températures variant de 25 à 60 °C et des valeurs de pH comprises entre 6 et 9.

L'évaluation du potentiel enzymatique a mis en évidence un bagage enzymatique prometteur. L'isolat produit l'amylase, la cellulase, la caséinase, l'estérase, la lécithinase et la lipase. Ces activités enzymatiques ont été observées aussi bien en absence qu'en présence de fortes concentrations en sel.

Par ailleurs, les essais de bioremédiation ont montré la capacité de la souche LMB3057 à décolorer certains colorants synthétiques, notamment le bleu de méthylène et le rouge Congo. La souche a également démontré sa capacité à se développer sur un milieu contenant le diesel comme seule source de carbone et d'énergie, suggérant son aptitude potentielle à dégrader certains hydrocarbures.

Cet isolat ainsi que ses enzymes peuvent constituer des candidats prometteurs pour diverses applications biotechnologiques.

Mots-clés : Extrêmophiles, extrêmoenzymes, bioremédiation, colorants synthétiques, diesel.

Liste des abréviations

API	:	Analytical Profile Index (Galerie d'identification biochimique)
BN	:	Bouillon Nutritif
EC	:	Enzyme Commission
GN	:	Gélose Nutritive
MPa	:	Méga Pascal
ONPG	:	Ortho-nitrophényl- β -D-
p/v	:	Poids / volume
PGP	:	Plant Growth-Promoting Bacteria (bactéries promotrices de la croissance des plantes)
pH	:	Potentiel hydrogène
Rpm	:	Rotation par minute
v/v	:	volume / volume

Liste des figures

- Figure 1 :** Photos de l'aspect microscopique de l'isolat LMB3057 après coloration de Gram. 14
- Figure 2 :** Photos de l'aspect macroscopique de l'isolat LMB3057 après 24 heures d'incubation à 30 °C sur GN à 10% de NaCl. 14
- Figure 3 :** Résultats de la recherche de la catalase (A) et le cytochrome oxydase (B). 15
- Figure 4 :** Résultat de la caractérisation par la galerie API 20 E LMB3057. 16
- Figure 5 :** Photos des résultats du screening des activités enzymatiques de l'isolat LMB3057. 17
- Figure 6 :** Photos des résultats de la recherche de la dégradation des colorants par l'isolat LMB3057 après incubation à 30°C 18
- Figure 7 :** Photos du résultat de la croissance sur le diesel après 24h d'incubation à 30°C. 19

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales classes d'extrémophiles et leurs conditions de croissance **4**

Introduction générale

La Terre subit des conséquences extrêmement graves dues aux activités humaines telles que l'agriculture moderne, l'industrialisation, la surpopulation. Ces activités contribuent à une production intense de polluants comme les phénols, les colorants azoïques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les composés polychlorés, les pesticides, les métaux lourds, etc. Ces substances chimiques résistent à la biodégradation et persistent longtemps dans l'environnement, provoquant des dommages aigus et chroniques qui menacent les composantes biotiques des écosystèmes **(McComb *et al.*, 2014)**. Ils peuvent provoquer des effets cancérogènes, mutagènes et toxiques sur les humains et les autres organismes, et affectent l'ensemble de la planète **(Liu *et al.*, 2019)**.

Les environnements extrêmes, tels que les lacs salins, les sebkhas, les sources hydrothermales, les lacs acides et fonds marins, abritent une diversité extraordinaire de microorganismes adaptés à des conditions de salinité élevée, de température, de pression et de pH variables. Ces microorganismes sont qualifiés extrêmophiles ou extrêmo-tolérants. Ils possèdent des mécanismes d'adaptation, leur permettant de survivre et de maintenir leur stabilité dans les conditions hostiles **(Menasria *et al.*, 2019 ; Saibi *et al.*, 2022)**.

Les microorganismes extrêmophiles possèdent également des caractéristiques biotechnologiques et industrielles spécifiques, à savoir la capacité de produire des biopolymères, des pigments, des antimicrobiens, des biosurfactants, des solutés compatibles et des extrêmoenzymes **(Aissaoui *et al.*, 2018 ; Arab *et al.*, 2018 ; Yadav *et al.*, 2018 ; Nas *et al.*, 2021 ; Saibi *et al.*, 2022)**.

Les extrêmoenzymes synthétisées par les microorganismes extrêmophiles présentent des propriétés remarquables, notamment une stabilité à de fortes concentrations salines, une activité maintenue sur une large gamme de températures et de pH, ainsi qu'une résistance aux solvants organiques. Ces caractéristiques leur confèrent un avantage considérable pour les applications industrielles et environnementales, en particulier dans le domaine de la bioremédiation des environnements extrêmes contaminés par des polluants organiques, tels que les colorants synthétiques présents dans les effluents textiles et les hydrocarbures pétroliers. Elles constituent ainsi une alternative écologique, sûre, efficace et peu coûteuse aux procédés conventionnels de dépollution **(Mesbah, 2022 ; Sun *et al.*, 2024)**.

L'Algérie est riche en milieu extrêmes naturels abritant une flore intéressante. La Grande Sebkha d'Oran constitue l'un des plus importants écosystèmes dans le pays. C'est un

écosystème hypersalin, qui héberge une source prometteuse de microorganismes produisant des métabolites secondaires originaux à activités antimicrobiennes et des extrêmoenzymes (**Nas *et al.*, 2021 ; Saibi *et al.* 2022**).

Notre étude s'inscrit dans une démarche de valorisation biotechnologique des microorganismes extrémophiles issus des habitats extrêmes algériens. Dans cette perspective, nous nous sommes fixé comme objectif principal le criblage des activités enzymatiques impliquées dans les processus de bioremédiation chez une bactérie extrémophile, désignée LMB3057.

Afin d'atteindre cet objectif, nous avons suivis la démarche suivante :

- Revivification et la vérification de la pureté de la souche LMB3057,
- Caractérisation phénotypique et biochimique de la souche
- Criblage de la production d'enzymes extracellulaires en présence et en absence de sel.
- Évaluer un exemple de potentiel de bioremédiation (décoloration des colorants synthétiques et croissance sur diesel).

Synthèse Bibliographique

1. Les microorganismes extrêmophiles

1. 1. Définition

Le concept extrêmophilie trouve son origine historique dans les travaux de **MacElroy (1974)**, qui a utilisé ce terme pour désigner les microorganismes capables de se développer dans des environnements jugés hostiles aux formes de vie conventionnelles.

Les microorganismes extrêmophiles possèdent une remarquable plasticité physiologique leur permettant non seulement de subsister, mais aussi de maintenir une activité métabolique optimale dans les conditions extrêmes (**Salwan et Sharma, 2020**).

1. 2. Les classes des microorganismes extrêmophiles

La classification des micro-organismes extrêmophiles s'établit principalement en fonction des caractéristiques physico-chimiques de leurs habitats naturels. Parmi les habitats extrêmes nous trouvons les sources hydrothermales sous-marines et les environnements géothermiques caractérisés par des températures élevées, les régions polaires et les zones abyssales caractérisées par des températures basses, les sédiments marins profonds caractérisés par les pression élevée, les lacs acides et les lacs alcalins et hypersalins (**Sysoev et al., 2021 ; Hamid et al., 2022 ; Kanekar et Kanekar, 2022 ; Rawat et al., 2024**).

Les microorganismes extrêmophiles colonisant ces habitats sont répartis en différentes classes ; les plus étudiées sont présentées dans **tableau 1**.

Tableau 1. Principales classes d'extrêmophiles et leurs conditions de croissance

Catégories	Conditions de croissances	Références
Hyper-thermophiles	L'optimum à T°C supérieure à 85°C.	(Gupta et al., 2014)
Thermophiles modérés	l'optimum de croissance se situe entre 40°C et 60°C.	(Gupta et al., 2014)
Thermophiles extrêmes	L'optimum entre 60°C et 85°C.	(Gupta et al., 2014)
Psychrophiles	L'optimum à des températures inférieures ou égales à 15 °C.	(Boetius et al., 2015)
Halophiles	Nécessitent le sel pour la croissance [NaCl] supérieure à 2% (p /v).	(Rahman et al., 2017)
Halotolérants	Tolèrent des concentrations croissantes en NaCl de 0 à 30%	(Rahman et al., 2017)
Acidophiles	Optimum à pH inférieur à 3	(Salwan et Sharma, 2020)
Alcalophiles	Optimum à pH égale ou supérieur à 9	(Sysoev et al., 2021)
piézophiles	Croissance à des pressions élevées supérieures à 10 MPa	(Scheffer and Gieg, 2023)
xérophiles	Croissance à activité d'eau inférieure à 0.8.	(Kanekar et Kanekar, 2022)
Métallophiles	Croissance en présence de métaux (Zn, Cd, Cu, Cr, Co, Ag, Pb, Hg...)	(Sinha et al., 2014)
Radiophiles	Croissance en présence de Rayons X, gamma et ultraviolet.	(Basu, 2022)

2. Les microorganismes des habitats salins et hypersalins

Les habitats salins et hypersalins sont caractérisés par leur concentration totale en sels solubles qui constituent des combinaisons ioniques neutres de différents cations et d'anions. Cette composition ionique est déterminée par les caractéristiques géologiques locales, elle se diffère d'un biotope à un autre, il peut s'agir des ions minéraux (Cl⁻, Ca²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺) ou organiques (acétate, carbonate, citrate, nitrate) ainsi que monoatomiques (F⁻) ou polyatomiques (SO₄²⁻) **(Oren, 2006 ; Ventosa et al., 2015)**.

Ces habitats sont représentés par des systèmes aquatiques comme la Mer Morte, le Grand Lac Salé et terrestres naturels, ainsi que des habitats issus de l'intervention humaine tels que les

saumures, les champs de pétrole, les étangs, les tanneries et les aliments salés (**Akpolat et al., 2015 ; Kiplimo et al., 2019**).

L'Algérie est riche en zones humides et écosystèmes salins naturels originaux, principalement dans le Sahara. Elle compte plus de 2 000 zones humides, une cinquantaine sont classées comme zones d'importance internationale dans le cadre de la convention de Ramsar tels que la Sebkha d'Ezzemoul (**Kharroub et al., 2006**), les lacs hypersalés de Sidi Ameer et de Himalatt (**Boutaiba et al., 2011**) et la grande Sebkha d'Oran (**Nas et al., 2021**).

Les communautés microbiennes abritant ces habitats sont conditionnées par plusieurs paramètres outre que la salinité tels que l'alcalinité, la faible concentration en oxygène, les variations de la température, les rayons solaires, les métaux lourds et d'autres composés toxiques (pesticides, produits chimiques) (**DasSarma et DasSarma 2012 ; Naghoni et al., 2017**).

Ces communautés sont divisées en deux communautés les microorganismes halophiles qui dépendent strictement de la présence du sel (NaCl) pour leur croissance, et les halotolérants qui sont capables de se développer en absence de sel et de tolérer des concentrations élevées en sel.

Sur la base de leur exigence saline et de leur optimum de croissance, **Kushner (1985)** a classé les microorganismes halophiles en trois catégories principales :

- **Les microorganismes légèrement halophiles** : présentent une croissance optimale dans des milieux contenant entre 2 % et 5 % de NaCl
- **Les halophiles modérés** : se développent dans des environnements où la concentration en NaCl varie entre 5 % et 20 %
- **Les halophiles extrêmes** : nécessitent des concentrations salines élevées, généralement comprises entre 20 % et 30 % de NaCl.

Selon le même auteur, au sein de la communauté des halotolérants, il existe également trois catégories :

- **Les microorganismes légèrement halotolérants** qui tolèrent des concentrations de NaCl allant de 0 jusqu'à 6 à 8% de NaCl (p/v).
- **Les halotolérants modérés** qui tolèrent des concentrations de NaCl allant de 0 jusqu'à 18 à 20% de NaCl (p/v).
- **Les halotolérants extrêmes** qui tolèrent toutes concentrations de NaCl varient de 0% de NaCl (p/v) jusqu'à le point de saturation (30% de sel).

3. Application des microorganismes halophiles et halotolérants en bioremédiation

Les constituants cellulaires des microorganismes halophiles et halotolérants possèdent des propriétés uniques et une grande stabilité leur permettant de se développer de manière optimale. Cette aptitude leur confère un potentiel biotechnologique important permet leur exploitation dans le domaine de la bioremédiation des environnements contaminés (**Martínez-Espinosa, 2024**).

La bioremédiation constitue une méthode efficace, économique et respectueuse de l'environnement permettant la restauration des milieux dégradés. De nombreuses études ont montré que les microorganismes halophiles et halotolérants constituent des candidats prometteurs pour la dépollution des milieux contaminés dans conditions extrêmes notamment la dépollution des eaux souterraines ainsi qu'à la restauration des milieux marins endommagés. Plusieurs espèces, notamment *Cellulomonas spp.*, *Bacillus marisflavi*, *Dietzia maris* et *Halomonas eurihalina*, ont démontré leur capacité à métaboliser des contaminants organiques à des concentrations atteignant 10 % de NaCl (**Lu et al., 2015 ; Zhao et al., 2017 ; Khalid et al., 2021**).

L'intérêt de ces microorganismes réside dans leur arsenal enzymatique dont leurs enzymes ne sont pas uniquement stables et actives à des concentrations élevées de sel, mais, elles sont également tolérantes à des températures froides et élevées, stables à des pH alcalins et en présence de solvants organiques (**Aljohny, 2015**). Les enzymes produites par les microorganismes extrémophiles sont appelées extremozymes (**Kumari et al., 2024**).

Les enzymes d'origine microbienne permettent la transformation des polluants en composés moins toxiques ou inoffensifs (**Narayanan et al., 2023**).

4. Principales enzymes microbiennes utilisés en bioremédiation

Les principales enzymes impliquées dans la bioremédiation sont les hydrolases, les cytochromes P450, les laccases, les déhalogénases, les protéases et les lipases. Ces enzymes ont démontré un fort potentiel dans la dégradation des polymères, des hydrocarbures aromatiques, des composés halogénés, des colorants, des détergents et des produits agrochimiques. Les mécanismes enzymatiques impliqués comprennent principalement l'oxydation, la réduction, l'élimination et l'ouverture des cycles aromatiques (**Bhandari et al., 2021**).

4. 1. Les hydrolases

Les hydrolases sont des enzymes qui catalysent la rupture des liaisons chimiques par l'intervention d'une molécule d'eau, entraînant ainsi la transformation de molécules complexes

en composés de plus faible masse moléculaire et contribuant à la réduction de la toxicité des polluants. Elles favorisent l'hydrolyse de diverses liaisons chimiques, notamment les liaisons C-C, C-O, C-N, S-S, S-N, S-P, C-P, ainsi que d'autres types de liaisons, en utilisant l'eau comme réactif. Ces enzymes catalysent également plusieurs réactions associées, telles que les réactions de condensation et d'alkoolyse (**Bhandari et al., 2021**).

Les principaux avantages de cette classe enzymatique résident dans leur disponibilité, leur faible coût, leur caractère respectueux de l'environnement, l'absence de nécessité de certains cofacteurs, ainsi que leur tolérance à l'ajout de solvants miscibles à l'eau (**Karigar et al., 2011**).

Les enzymes hydrolytiques microbiennes, telles que les lipases, les estérases, les amylases, les protéases, les cellulases, les nitrilases, les peroxydases et les cutinases, peuvent être mises à profit pour la gestion des déchets issus de l'industrie agroalimentaire, la dégradation des plastiques et des insecticides, le traitement des dépôts de biofilms ainsi que la dépollution des sols contaminés par les hydrocarbures (**Kumar et Sharma, 2019**).

L'hydrolyse des liaisons ester, amide et peptidique par les estérases, les amidases et les protéases conduit à la formation de produits présentant une faible toxicité, voire nulle. Des hydrolases produites par des bactéries appartenant aux genres *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Nocardia* et *Bacillus*, ont été utilisées avec succès pour la transformation de polluants tels que le carbofurane, le carbaryl, le parathion, le diazinon et le coumaphos (**Bhandari et al., 2021**).

4. 2. Cytochromes P450

Le cytochrome P450 (EC 1.14.14.1) constitue une superfamille d'enzymes ubiquistes, présentes dans les trois domaines du vivant : les Eucaryotes, les Bactéries et les Archées. Ces enzymes assurent une grande diversité de fonctions, allant de la biosynthèse de produits naturels complexes et du métabolisme des médicaments dans les organismes vivants à la biotransformation de composés toxiques présents dans les écosystèmes. Les cytochromes P450 possèdent une capacité intrinsèque à dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les composés chlorés et certains pesticides. Ces réactions jouent un rôle central dans les processus de bioremédiation (**Li et al., 2020**).

4. 3. Les laccases.

Les laccases (benzènediol : oxygène oxydoréductases (EC 1.10.3.2) sont des enzymes extracellulaires constituées de glycoprotéines monomériques, dimériques ou tétraédriques, (**Shraddha et al., 2011**). Elles sont capables d'oxyder les composés phénoliques, les amines

aromatiques, les colorants synthétiques et les hydrocarbures aromatiques. Elles possèdent une grande stabilité thermique, une tolérance au pH, une résistance aux solvants et une activité dans les milieux salins. Elles sont largement utilisées dans la décoloration des effluents textiles, la dégradation du bisphénol A et le traitement des eaux usées industrielles.

4. 4. Les déhalogénases

Les déhalogénases microbiennes (EC 3.8.1.5) suscitent un intérêt considérable en raison de leur rôle important dans la bioremédiation des composés organiques halogénés. Elles catalysent la rupture des liaisons carbone-halogène des polluants halogénés tels que les bromophénols ; les chlorophénols ; les biphényles polychlorés et les composés bromés. (Bhandari *et al.*, 2021).

Elles interviennent selon trois principaux mécanismes : hydrolytique, réducteur et oxygénolytique. Ces processus permettent l'élimination des atomes d'halogène, soit par leur substitution par un groupe hydroxyle provenant de l'eau, soit par leur remplacement par un atome d'hydrogène issu de l'hydrogène moléculaire (Wang *et al.*, 2018).

5. Autres applications biotechnologiques des microorganismes halophiles et halotolérants

L'aptitude des microorganismes halophiles et halotolérants à supporter les conditions extrêmes ainsi que leur grande diversité métabolique leur confèrent d'autres potentialités biotechnologiques autres que la production d'extrêmoenzymes.

Ils produisent des solutés compatibles qui sont des molécules organiques de faible poids moléculaire et très hydrosolubles pour assurer leur équilibre osmotique ; ce sont des osmoprotecteurs compatibles qui peuvent être des sucres, des polyalcools et leurs dérivés ou des acides aminés et leurs dérivés. Ces molécules possèdent un grand intérêt dans différentes industries, ils sont utilisés en industrie comme stabilisants d'enzymes, des acides nucléiques, de membranes et de cellules entières vis-à-vis les températures élevées et la dessiccation (Reang *et al.*, 2024).

Les microorganismes halophiles et halotolérants produisent également des pigments qui jouent un rôle protecteur important en protégeant les cellules contre les rayonnements UV, le stress oxydatif et d'autres facteurs de stress présents dans les milieux extrêmes. Ils agissent également comme un bouclier pour protéger le microorganisme producteur contre les composés antimicrobiens naturels sécrétés par d'autres microorganismes. Ces pigments possèdent des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, anticancéreuses et photoprotectrices, ce qui leur confère un intérêt considérable dans les domaines pharmaceutique, alimentaire et biotechnologique (Rawat *et al.*, 2024).

Un autre type de molécules synthétisées par les microorganismes halophiles et halotolérants, les biosurfactants. Ces molécules sont des agents tensio-actifs synthétisés par les microorganismes pour améliorer l'assimilation des composés insolubles dans l'eau, tels que les hydrocarbures, afin de les métaboliser. En effet, les biosurfactants facilitent l'attachement des cellules aux hydrocarbures en augmentant leur solubilité dans l'eau (émulsification) et leur diffusion à l'intérieur de la cellule microbienne. Leur capacité à modifier les propriétés interfaciales et à induire la formation d'émulsion, la séparation de phases, la solubilisation, le mouillage, la détergence et la réduction de viscosité, permet de les appliquer dans une grande variété de procédés industriels et biotechnologiques impliquant l'agriculture en jouant le rôle d'antagonistes, la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures, les polluants organiques et les métaux lourds, et l'industrie pétrolière, particulièrement dans les opérations de nettoyage des bacs de stockage du pétrole **(Huang et al., 2010)**.

Les microorganismes halophiles et halotolérants synthétisent aussi les exopolysaccharides qui sont des polymères constitués majoritairement d'un enchainement d'oses. Ces molécules remplissent plusieurs fonctions, celles d'une barrière physique contre la phagocytose, la dessiccation, les biocides, les radiations UV, les surfactants et les antibiotiques, ou encore une fonction essentielle dans les processus d'interactions et reconnaissances cellulaires. En termes d'exploitation biotechnologique, les exopolysaccharides présentent quelques atouts, dont ils peuvent être utilisés pour modifier les propriétés rhéologiques des systèmes aqueux en améliorant la viscosité des solutions, même à des concentrations faibles. Ces polymères sont utilisés comme des agents stabilisants, épaississants, gélifiants et émulsifiants, dans l'industrie pharmaceutique, l'industrie du Pétrole, l'agro-alimentaire, du papier, du textile et cosmétique. Ils sont également utilisés comme dissolvants métalliques et bio-absorbants dans la récupération du pétrole, les mines et les industries du pétrole **(Biswas et Paul, 2014 ; Arundhati et al., 2015)**.

Les microorganismes halophiles et halotolérants jouent également des rôles essentiels dans divers procédés de fermentation des denrées alimentaires qui se réalisent en présence de sel **(Aljohny, 2015)**, et dans la stimulation de la croissance végétale **(PGP)** pour atténuer le problème de la salinité des sols et améliorer leur fertilisation **(Ramadoss et al., 2013)**.

Matériel et Méthodes

Ce travail porte sur la recherche de la production des enzymes utilisées en bioremédiation par une souche bactérienne extrêmophile du genre *Bacillus* nommée LMB3057 et issue de la grande sebkha d'Oran .

4. Origine de la souche LMB3057

La souche utilisée pour cette étude provient d'une collection de souches bactériennes isolées par Dr. NAS Fatima, le 14 février 2014, à partir des échantillons d'eau prélevés de la grande Sebkha d'Oran. La collection a été conservée à -20°C sur Bouillon Nutritif à 10% de NaCl (p/v) additionné de 25 % de glycérol (v/v).

5. Revivification et vérification de la pureté de la souche

La revivification de la souche a été effectuée sur Bouillon Nutritif à 10 % de NaCl (p/v). A partir des suspensions conservées, 100 µL ont été inoculés dans 10 mL de Bouillon Nutritif à 10 % de NaCl (p/v) puis incubés à 30°C. Après incubation, des repiquages successifs ont été effectués, par la technique d'épuisement, sur la Gélose Nutritive à 10 % de NaCl (p/v) afin d'assurer la pureté de notre isolat.

La souche a été de nouveau conservée à 4°C sur Gélose Nutritive inclinée contenant 10% de NaCl (p/v), et à -20°C sur Bouillon Nutritif à 10% de NaCl (p/v) et 25% (v/v) de glycérol pour une conservation à long terme.

6. Caractérisation phénotypique de la souche LMB3057

La caractérisation phénotypique de l'isolat LMB3057 a été effectuée en suivant les tests recommandés par **Logan et al. (2009)** pour la description des bactéries aérobies formant d'endospores.

3. 1. Détermination des caractères microscopiques

Les caractères microscopiques de notre isolat ont été déterminés après 24 heures d'incubation à 30°C sur Gélose Nutritive à 10 % de NaCl.

- La mobilité a été vérifiée par l'examen à l'état frais.
- La morphologie, l'arrangement cellulaire et le type de paroi ont été déterminés après coloration de Gram.

3. 2. Caractères macroscopiques

Les caractères culturels des isolats (taille, forme, pigmentation, opacité, élévation et consistance des colonies) ont été déterminés après 24 heures d'incubation à 30°C sur Gélose Nutritive à 10 % de NaCl.

3. 3. Croissance à différentes conditions de température, pH et salinité

Les intervalles des différentes conditions physicochimiques (salinité, température et pH) permettant la croissance de notre isolat ont été déterminés sur milieu gélosé en variant une de ces conditions alors que les deux autres sont maintenues constantes. La croissance a été suivie quotidiennement durant 72 heures (**Gomri et al., 2021**).

- Pour la recherche de la gamme de salinité permettant la croissance, l'isolat a été ensemencé sur GN à pH 7 contenant les concentrations en NaCl suivantes : 0, 1, 10, 15, 20, 25 et 30 % (p/v). Les cultures sont ensuite incubées à 30°C.
- Pour la température permettant la croissance, elle a été déterminée par incubation de l'isolat ensemencé sur GN à 10% de NaCl et pH 7 dans les températures suivantes 25, 30, 37, 45, 55 et 60°C.
- Quant au pH, l'isolat a été ensemencé sur GN à 10% de NaCl ajustée à des pH de 4, 5, 6, 7, 8 et 9. L'incubation a été effectuée à 30°C.

3. 4. Caractères biochimiques

3. 4. 1. Recherche de la catalase

Ce test consiste à mettre en contact une colonie avec une goutte de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . La présence de la catalase se traduit par un dégagement immédiat des bulles gazeuses (**Health Protection Agency, 2011**).

3. 4. 2. Recherche de la Cytochrome-oxydase

Le cytochrome oxydase est la dernière enzyme de la chaîne respiratoire. Elle assure le Transfert des électrons sur l'oxygène ou sur un autre oxydant minéral. Sa recherche s'effectue En mettant en contact l'isolat avec des disques imprégnés par le réactif oxalate de N, N-diméthyl-1,4-phénylène diaminedichlorure de couleur rose.

Dans un tube à hémolyse contenant de l'eau physiologique inoculé par la souche, on dépose un disque d'oxydase. Après quelques minutes, la présence de l'enzyme se traduit par le virage de la couleur rose du disque vers un violet noirâtre (**Public Health England, 2014**).

3. 4. 3. La galerie API 20E

La plaque API 20E permet d'étudier 20 tests biochimiques, 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 H_2S , d'Uréase (URE), du tryptophane désaminase (TDA), d'indole (IND), d'acétoïne (VP), la liquéfaction de la gélatine (GEL) et la dégradation des sucres.

La préparation de l'inoculum a été effectuée dans du Bouillon Nutritif à 10% de NaCl à partir des cultures de 24 heures sur GN à 10% de NaCl. La densité optique de la suspension a été standardisée à 0.1 à la longueur d'onde de 590 nm. L'inoculation de la plaque a été effectuée conformément aux directives mentionnées dans le catalogue fourni avec les plaques (**voir annexe**)

Après 24 heures d'incubation, les réactions se manifestent par des virages de couleur spontanés ou mis en évidence par l'ajout de réactifs. L'interprétation des résultats se réfère au catalogue joint avec les plaques (**voir annexe**).

4. Mise en évidence du potentiel biotechnologique de l'isolat LMB3057

4. 1. Recherche de la production des enzymes extracellulaires sur milieu gélosé

La production des enzymes par l'isolat a été recherchée en présence et en absence de sel. L'isolat a étéensemencé sur milieux de base, Gélose Nutritive et la Gélose Nutritive à 10% (p/v), supplémentés de substrat à dégrader (voir annexe). La lecture des résultats a été effectuée quotidiennement pendant 3 jours d'incubation à 30°C.

4. 1. 1. Recherche de l'amylase

La production de l'amylase a été recherchée en ajoutant 1% (p/v) d'amidon dans les milieux de culture utilisés. Après incubation, les cultures sont recouvertes par une solution de Lugol. L'absence de la coloration autour de la culture indique la dégradation de l'amidon alors que les zones contenant l'amidon se colorent en brun (**Kumar et al., 2012**).

4. 1. 2. Recherche de la cellulase

L'activité cellulosique a été recherchée en ajoutant 1% (p/v) de cellulose dans les différents milieux de culture. Après incubation, les cultures sont recouvertes par une solution de Rouge Congo (1% p/v) pendant 20 minutes puis lavées par une solution de NaCl (1M) pendant 15 minutes. L'hydrolyse de la cellulose se traduit par l'apparition de zones claires autour des colonies (**Thaz et al., 2015**).

4. 1. 3. Recherche de la caséinase

La mise en évidence de l'enzyme caséinase a été effectuée en ajoutant 10% (p/v) de lait écrémé stérile dans les milieux étudiés. L'apparition d'un halo clair autour de la culture indique la dégradation de la caséine (**Jayachandra et al., 2012**).

4. 1. 4. Recherche des estérases

4. 1. 4. 1. Hydrolyse du Tween 80

Ce test a été réalisé par l'ajout de 1% (v/v) de Tween 80 stérilisé dans les milieux de culture. Après incubation, la dégradation du tween 80 se manifeste par l'apparition d'un Précipité autour de la culture (**Kumar et al., 2012**).

4. 1. 4. 2. Recherche de la lécithinase

Ce test a été réalisé en ajoutant 10 mL de l'émulsion du jaune d'œuf stérile au 90 mL du milieu de culture. Après incubation, l'apparition d'une zone claire autour de la culture témoigne la production de la lécithinase par l'isolat (**De Vos et al., 2009**).

4. 1. 4. 3. Recherche de la lipase

Ce test a été réalisé en ajoutant 2,5% (v/v) de l'huile d'olive stérilisée dans les milieux de Culture. Après incubation, la présence de la lipase se manifeste par l'apparition D'une zone claire autour de la culture (**Sigurgísladóttir et al., 1993**).

4. 2. Essai d'application biotechnologique en présence de polluants

4. 2. 1. Criblage primaire de la biodégradation des colorants sur milieu solide

Notre isolat a été évalué pour sa capacité à dégrader trois colorants : le bleu de méthylène, le rouge Congo et le violet de Gentiane selon le protocole de **Kushvaha et al. (2022)**.

L'ensemencement a été réalisé par strie, en triplicata, sur des boîtes de milieu minimal (voir annexe), Gélose Nutritive et Gélose Nutritive à 10% de NaCl, chacun incorporé avec l'un des trois colorants à une concentration de 50 mg/L.

Les boîtes ont ensuite été incubées à 30 °C pendant 20 jours. Des observations quotidiennes ont été effectuées afin de détecter l'apparition de zones de clarification témoignant de la dégradation des colorants.

4. 2. 2. Test de croissances sur le carburant Diesel

Le pouvoir de l'isolat LMB3057 à se développer en présence du carburant Diesel a été évalué sur milieu minimal supplémenté en diesel comme seule source de carbone et d'énergie selon le protocole de **Dohare et al. (2024)**, avec quelque modification.

Une colonie de 24 heures sur Gélose Nutritive à 10% de NaCl a été introduite dans 10mL de milieu minimal (**voir annexe**) supplémenté de 300 µL de diesel. L'incubation a été effectuée à 30°C sous agitation à 180 rpm. La croissance a été suivie par des observations régulières portant sur l'apparition d'un trouble du milieu, indiquant l'utilisation potentielle du diesel par l'isolat.

Résultats et Discussion

1. Résultats

1. 1. Caractérisation phénotypique de l'isolat LMB3057

1. 1. 1. Caractérisation microscopique

Les caractères microscopiques de l'isolat ont été déterminés après 24 heures d'incubation à 30°C sur Gélose Nutritive à 10% de NaCl. L'examen à l'état frais a montré que la souche est mobile. La coloration de Gram a révélé la forme bâtonnet avec un type de paroi à Gram positif (**Figure 1**).

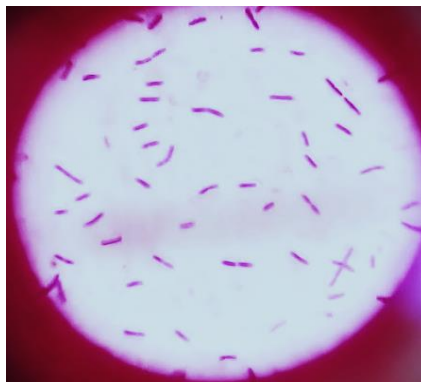


Figure 1 : L'aspect microscopique de l'isolat LMB3057 après coloration de Gram (Photo personnelle).

1. 1. 2. Caractérisation macroscopique

L'étude des caractères macroscopiques de l'isolat LMB3057 a été réalisée après une incubation de 24 heures à 30 °C sur un milieu gélose nutritive supplémenté à 10% de NaCl. Les colonies présentent une forme circulaire à contour légèrement régulier. Leur taille est moyenne à grande, avec un diamètre variant entre 3 et 4 millimètres. Elles sont de couleur blanc-crème et possèdent un aspect translucide. Leur surface est légèrement bombée lisse et brillante, avec une consistance de type muqueuse (**Figure 2**).



Figure 2 : L'aspect macroscopique de l'isolat LMB3057 après 24 heures d'incubation à 30 °C sur GN à 10% de NaCl (Photo personnelle)

1. 1. 3. Caractérisation physiologique

La croissance de l'isolat LMB3057 a été étudiée sur milieu gélosé à différentes conditions de salinité, de température et de pH.

Le test de la croissance à différentes salinités a permis de définir un profil halotolérant extrême dont la souche LMB3075 pousse sur une gamme de salinité de 0 à 25% de NaCl avec un optimum enregistré à 0%.

Le test de la croissance à différentes températures a été effectué sur une gamme allant de 25 à 60°C. Les résultats ont révélé un profil thermotolérant, dont l'isolat a exhibé une croissance sur toute la gamme explorée avec un optimum dans une plage de 30 à 55°C.

En ce qui concerne la croissance à différents pH, les résultats obtenus ont indiqué que l'isolat est neutrophile à tendance alcalophile, il préfère des pH neutres et proches de l'alcalinité, allant de 6 à 9 avec un optimum de croissance à pH égal à 7 et une faible croissance pH 5.

1. 1. 4. Caractérisation biochimique

La recherche de la catalase et le cytochrome oxydase a montré que l'isolat LMB3075 possède les deux enzymes. Les résultats sont illustrés dans la **figure 3**.

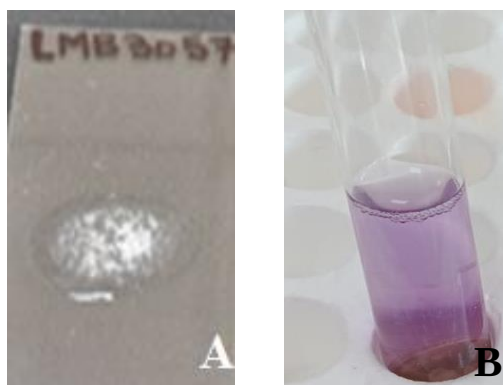


Figure 3: Résultats de la recherche de la catalase (A) et le cytochrome oxydase (B).

Les résultats de la caractérisation de l'isolat LMB3073 par la galerie API 20E sont montés dans la **figure 4**, ils ont permis de déterminer le profil biochimique suivant :

- L'isolat ne produit pas la β -galactosidase, la Lysine décarboxylase, l'Ornithine décarboxylase et la gélatinase. Il ne possède pas la tryptophanase responsable de la production d'indole, et ne produit pas l' H_2S .
- Il possède l'Arginine dihydrolase, l'uréase, la Tryptophane désaminase et produit de l'acétoïne.
- Il utilise le citrate comme seul source de carbone et d'énergie.

- En ce qui concerne les sucres, l'isolat utilise un seul sucre qui est le glucose



Figure 4: Résultat de la caractérisation par la galerie API 20 E LMB3057.

1. 2. Mise en évidence du potentiel biotechnologique de l'isolat LMB3057

1. 2. 1. Screening des activités enzymatiques extracellulaires

Le potentiel de production des enzymes hydrolytiques par l'isolat a été évalué qualitativement à différentes concentrations NaCl. Le milieu utilisé est la Gélose Nutritive à 0 et 10 % de NaCl (p/v) supplémenté par les différents substrats à dégrader, en l'occurrence : l'amidon, la caséine, l'émulsion du jaune d'œuf, la cellulose, le Tween 80 et l'huile d'olive pour mettre en évidence la production de l'amylase, la protéase, la lécithinase, la cellulase, l'estérase, et la lipase respectivement.

Les résultats obtenus montrent notre isolat est capable d'hydrolyser tous les substrats utilisés, il possédait des activités enzymatiques extracellulaires amylolytique, protéolytique, cellulolytique et lipolytiques.

La production de ces activités hydrolytiques a été observée en absence et en présence de NaCl. Ce test donne une évaluation qualitative des activités enzymatiques. En estimant les diamètres des zones d'hydrolyse générées, la production de ces activités par notre isolat apparaît intéressante (**Figure 5**).

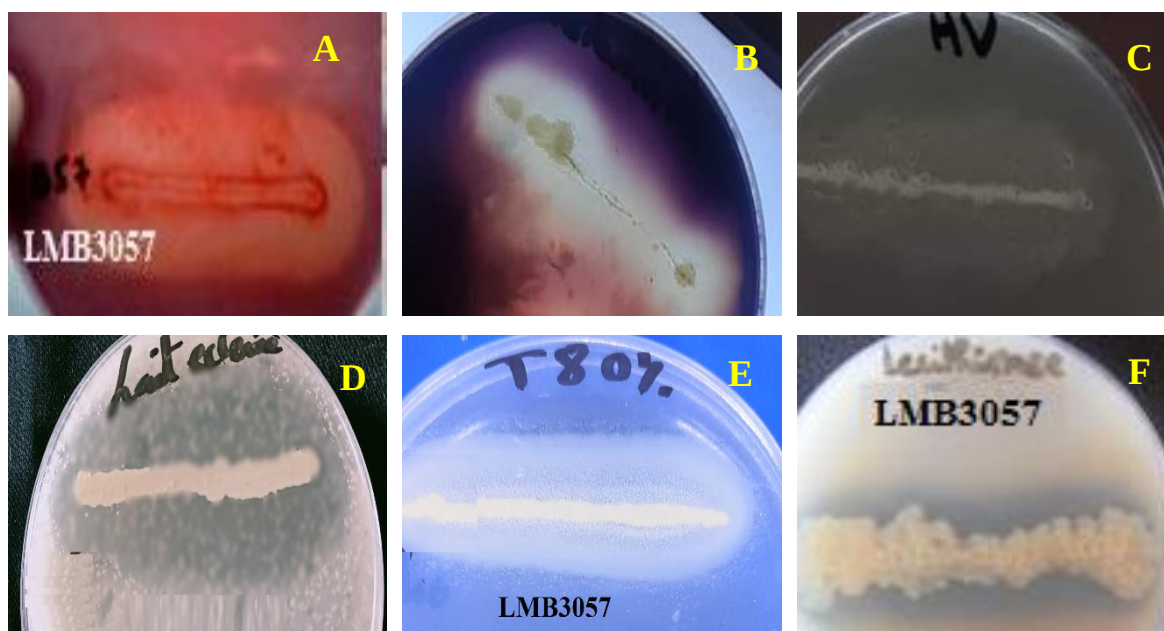


Figure 5 : Résultats du screening des activités enzymatiques de l'isolat LMB3057. Hydrolyse de la cellulose à 10% de NaCl (A), Hydrolyse de l'amidon à 10% de (B), Hydrolyse de l'huile d'olive à 10% de NaCl (C), Hydrolyse de la caséine en absence de NaCl (D), Hydrolyse du Tween 80 en absence de NaCl (E), Hydrolyse de la lécithine en absence de NaCl (F) (Photo personnelle).

1 .2. 2. Criblage primaire de la biodégradation des colorants sur milieu solide

Le pouvoir de dégradation des colorants par notre isolat a été étudié vis-à-vis trois colorants à une concentration de 50 mg/L (le bleu de méthylène, le rouge Congo et le violet de Gentiane) sur milieu minimal, Gélose Nutritive et Gélose Nutritive à 10% de NaCl.

Les résultats obtenus ont montré que l'isolat possède un pouvoir de dégradation du Bleu de méthylène et le Rouge Congo dont des zones de décoloration ont été observées autour des stries après 20 jours d'incubation à 30 °C. Aucune activité n'a été observée vis-à-vis le violet de Gentiane (**Figure 6**)

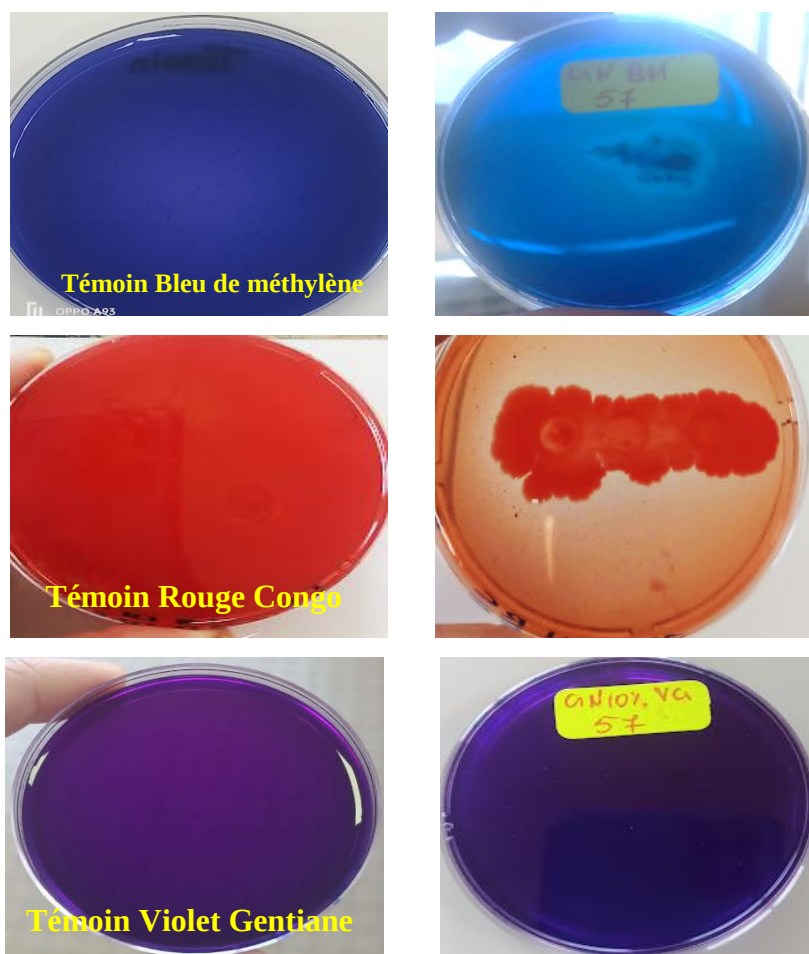


Figure 6 : Résultats de la recherche de la dégradation des colorants par l'isolat LMB3057 après incubation à 30°C pendant 20 jours (Photo personnelle).

1. 2. 3. Test de la croissance sur carburant Diesel

Le pouvoir de l'isolat LMB3057 à se développer en présence du carburant Diesel a été évalué sur milieu minimal supplémenté en diesel comme seule source de carbone et d'énergie. Après incubation à 30°C sous agitation à 180 rpm, un trouble du milieu a été observé dans le tube de milieu minimal supplémenté en diesel, indiquant que la souche LMB3057 est capable d'utiliser le diesel comme source de carbone et d'énergie (**Figure 7**).

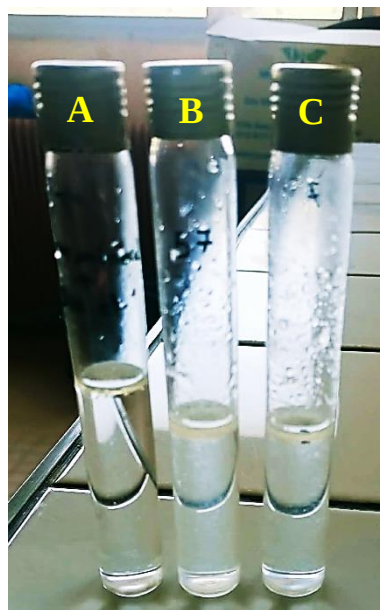


Figure 7 : Résultat de la croissance sur le diesel après 24h d'incubation à 30°C. Tube A : témoin négatif contient le milieu minimal + le diesel ; Tube B et C: milieu minimal + diesel + colonie de l'isolat LMB3057.

2. Discussion

La présente étude avait pour objectif de mettre en évidence le potentiel biotechnologique de la souche extrêmophile LMB3057 isolée de la Grande Sebkhah d'Oran, à travers sa caractérisation microscopique, macroscopique, physiologique et biochimique ainsi que l'évaluation de ses capacités enzymatiques et de bioremédiation. Les résultats obtenus révèlent que cette souche possède plusieurs caractéristiques favorables à son utilisation dans des applications environnementales et industrielles.

La caractérisation microscopique a montré que l'isolat présente les traits majeurs du genre *Bacillus*, c'est un bâtonnet à Gram positif, formant d'endospores, mobile et possède la catalase (De Vos *et al.*, 2009). Les espèces de ce genre sont omniprésentes et colonisent même les milieux extrêmes en raison de leur capacité à former des endospores résistantes et qui leur protègent contre diverses conditions difficiles, comme les rayonnements la salinité, la dessiccation, UV ou la dessiccation.

De nombreuses études ont rapportés les potentialités d'applications biotechnologiques des espèces du genre *Bacillus*. Elles produisent des enzymes actives à des conditions extrêmes des composés antimicrobiens et anticancéreux, et des biosurfactants elles stimulent la croissance végétale par leur caractère PGP (Plant growth promoting) et fertilisent les sols par leur capacité de fixer l'azote et solubiliser le phosphate (Harirchi *et al.*, 2022),

L'étude de la croissance à différentes concentrations de NaCl a révélé une croissance sur une large gamme de salinité allant de 0 à 25 % de NaCl, avec un optimum observé en absence de sel. Cette observation suggère que la souche LMB3057 appartient au groupe des bactéries halotolérantes extrêmes selon la définition de **Kushner (1985)**.

La capacité de croissance observée sur une large plage de températures allant de 25 à 60°C. Selon **Bowers et al. (2009)**, ces caractéristiques permettent de classer l'isolat dans la catégorie des bactéries thermo-tolérantes.

L'évaluation de la croissance à différents pH a révélé une croissance optimale à des pH neutres et légèrement alcalins. Ce profil correspond à celui des espèces alcali-tolérantes qui présentent une croissance optimale près de la neutralité tout en tolérant des pH alcalins (**Bowers et al., 2009**). Les microorganismes isolés des habitats salins et hypersalins développant aussi bien dans des conditions alcalines.

La recherche de la production des enzymes hydrolytiques a montré que notre isolat possède un arsenal enzymatique fascinant. Elle produit un large éventail d'enzymes extracellulaires qui sont l'amylase, la cellulases, la protéase, la lipase et l'estérase. La diversité de ces activités enzymatiques reflète une forte capacité d'adaptation métabolique permettant l'utilisation de substrats organiques variés présents dans l'environnement naturel.

Ces activités ont été produites en absence et en présence d'une concentration élevée de NaCl (10%). Le maintien de ces activités hydrolytiques en présence de 10 % de NaCl constitue un résultat particulièrement important. En effet, les enzymes produites par les microorganismes non halophiles perdent généralement leur activité dans les milieux fortement salins. Cette stabilité enzymatique pourrait être liée à des modifications structurales spécifiques, notamment un enrichissement en résidus acides à la surface des protéines, permettant de préserver leur conformation tridimensionnelle dans les environnements hypersalins. Ces observations rejoignent celles rapportées par **Arab et al. (2018)** et **Saibi et al. (2022)**, qui ont démontré le potentiel des extrêmoenzymes issues des microorganismes halophiles et halotolérantes pour diverses applications industrielles.

Les protéases issues des microorganismes présentent un intérêt considérable en raison de leur faible coût de production, de leur rendement élevé et de leur grande efficacité catalytique. Elles sont largement utilisées dans de nombreux secteurs industriels, notamment l'industrie du cuir, l'industrie agroalimentaire ainsi que le traitement des eaux usées. Ces enzymes ont présentées environ les deux tiers de la production commerciale mondiale de protéases et plus de 60 % des ventes totales d'enzymes industrielles, ce qui témoigne de leur importance économique et biotechnologique (**Bhandari et al., 2021**).

Les protéases sont également utilisées dans les procédés de bioremédiation des déchets de crustacés marins, notamment lors de l'extraction de la chitine après l'étape de déprotéinisation. L'utilisation de protéases permet d'éliminer les protéines associées aux carapaces, facilitant ainsi la récupération de la chitine. À cet égard, la protéase alcaline produite par *Bacillus licheniformis* MP1 a permis d'atteindre un taux de déprotéinisation de 75 %.

Les lipases hydrolysent les lipides d'origine microbienne, animale ou végétale et contribuent à la réduction des hydrocarbures présents dans les sols contaminés. Ces enzymes possèdent de nombreuses applications, notamment dans la bioremédiation des résidus huileux, des contaminants pétroliers, des effluents industriels et des sols pollués. Elles trouvent également des applications dans divers secteurs industriels, tels que les industries thérapeutique, de la polymérisation, des pâtes et papiers ainsi que des cosmétiques, en raison de leurs faibles besoins énergétiques, de leur grande spécificité vis-à-vis des substrats, de leur stabilité élevée, de la réduction des temps de traitement et de leur production économique (**Gurung *et al.*, 2013 ; Arora *et al.*, 2020**).

Concernant les essais de la décoloration des colorants, la souche LMB3057 a montré une capacité de décoloration du bleu de méthylène et du rouge Congo. Cette activité suggère l'intervention d'enzymes oxydatives ou réductrices capables d'altérer la structure chimique des colorants. Les mécanismes impliqués pourraient inclure l'action de peroxydases ou de laccases, enzymes fréquemment associées à la biodégradation des colorants synthétiques. Les différences observées entre les colorants testés pourraient s'expliquer par leurs structures chimiques respectives. Le rouge Congo, par exemple, contient des liaisons azoïques susceptibles d'être réduites par certaines enzymes bactériennes, tandis que le bleu de méthylène peut être dégradé par des réactions d'oxydoréduction spécifiques (**Shraddha *et al.*, 2011**).

En revanche, aucune activité de dégradation n'a été observée vis-à-vis du violet de gentiane. Cette absence de décoloration pourrait être expliquée par la complexité moléculaire de ce colorant ou à son effet toxique sur les systèmes enzymatiques impliqués par notre isolat dans la biodégradation.

La croissance observée sur milieu minimal contenant le diesel comme unique source de carbone constitue également un résultat prometteur. Elle indique que la souche est capable d'utiliser certains composés hydrocarbonés pour assurer son développement. Cette aptitude pourrait être associée à la production d'enzymes lipolytiques et oxydatives participant à l'initiation de la dégradation des hydrocarbures. Toutefois, la simple observation du trouble du milieu ne permet pas d'affirmer avec certitude la dégradation effective du diesel. Des analyses quantitatives complémentaires, notamment chromatographiques, seraient nécessaires pour

confirmer l'utilisation et la transformation des différentes fractions hydrocarbonées (**Kumar et Sharma, 2019**).

Conclusion et Perspectives

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation biotechnologique des microorganismes extrêmophiles issus des milieux hypersalins algériens. L'objectif principal était de caractériser phénotypiquement la souche bactérienne extrêmophile LMB3057, appartenant au genre *Bacillus*, et évaluer son potentiel enzymatique et bioremédiation.

Les résultats obtenus ont montré que la souche LMB3057 est une bactérie Gram positif, mobile, présentant une forte capacité d'adaptation à des conditions environnementales variées. Elle a démontré une croissance sur une large gamme de salinité (0 à 25 % NaCl), de température (25 à 60 °C) et de pH (6 à 9), confirmant ainsi son caractère halotolérant extrême, thermotolérant et alcalophile.

La caractérisation biochimique a mis en évidence la présence de plusieurs activités métaboliques importantes, notamment la production de la catalase et du cytochrome oxydase, ainsi que l'aptitude à utiliser différentes sources nutritives.

L'évaluation du potentiel biotechnologique de cette souche a mis en évidence la production de plusieurs enzymes extracellulaires d'intérêt industriel et environnemental, notamment l'amylase, la cellulase, la caséinase, l'estérase, la lécithinase et la lipase. Ces activités ont été observées en absence et en présence de fortes concentrations en sel, ce qui suggère une bonne stabilité fonctionnelle de ces enzymes.

Par ailleurs, les essais de bioremédiation ont montré que la souche LMB3057 possède la capacité de dégrader certains colorants synthétiques, notamment le bleu de méthylène et le rouge Congo, tout en étant capable de se développer sur un milieu contenant du diesel comme unique source de carbone et d'énergie. Ces résultats témoignent du potentiel prometteur de cette bactérie dans la dépollution biologique des environnements contaminés par les hydrocarbures et les effluents industriels colorés.

Notre étude montre que la grande sebkha d'Oran constitue un réservoir prometteur de souches microbiennes présentant des propriétés biotechnologiques remarquables. La souche LMB3057 apparaît comme un candidat intéressant pour le développement de stratégies de bioremédiation respectueuses de l'environnement et adaptées aux conditions extrêmes.

Les résultats obtenus lors de notre travail ouvrent plusieurs perspectives de recherche et de valorisation

- Réaliser une identification moléculaire approfondie de la souche LMB3057 par séquençage du gène ARNr 16S afin de confirmer son statut taxonomique et de mieux comprendre ses relations phylogénétiques.

Conclusion et perspectives

- Optimiser les conditions de production pour chaque enzyme en étudiant plusieurs paramètres outre la salinité, tels que la température, le pH, la composition du milieu de culture et la durée d'incubation.
- Purifier et caractériser les enzymes produites afin d'évaluer la stabilité de leur activité catalytique et leur comportement dans différentes conditions physicochimiques.
- Réaliser des essais de bioremédiation en conditions réelles afin de valider l'efficacité de cette souche dans le traitement des sites pollués.
- Étudier les mécanismes impliqués dans la dégradation des colorants et des hydrocarbures ainsi que les voies métaboliques responsables de ces processus.
- Évaluer la capacité de biodégradation de la souche sur d'autres polluants organiques persistants présents dans les effluents industriels et les sols contaminés.

*Références
bibliographiques*

Références Bibliographiques

1. **Aissaoui, N., Mahjoubi, M., Nas, F., Mghirbi, O., Arab, M., Souissi, Y., Hoceini, A., Masmoudi, A. S., Mosbah, A., Cherif, A., & Klouche-Khelil, N. (2018).** Antibacterial potential of 2,4-Di-tert Butylphenol and Calixarene-based prodrugs from thermophilic *Bacillus licheniformis* isolated in algerian hot spring. *Geomicrobiology Journal*. 1-10. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1503377>.
2. **Akpolat, C., Ventosa, A., Birbir, M., Sánchez-Porro, C., & Caglayan, P. (2015).** Molecular identification of moderately halophilic bacteria and extremely halophilic archaea isolated from salted sheepskins containing red and yellow discolorations. *Journal American Leather Chemists Association*, 110, 211-220.
3. **Aljohny, B. O. (2015).** Halophilic Bacterium - A Review of New Studies. *Biosciences Biotechnology Research Asia*,. 12 (3), 2061-2069. <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/1874>.
4. **Arab, M., Bakour, S., Lalaoui, R., Aissaoui, N., Nas, F., Hoceini, A., Fournier P. E, Klouche-Khelil, N. (2018).** Diversity of aerobic *Bacilli* analysis using molecular and culture-based approaches in debagh hot spring. *Geomicrobiology Journal*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.152093>.
5. **Arora, N. K., Mishra, J., & Mishra, V. (2020).** Microbial enzymes: Roles and applications in industries. In N. K. Arora (Ed.), *Microorganisms for sustainability*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-0>.
6. **Arundhati, P., Biswas, A., Chatterjee, S., & Paul, A. K. (2015).** Optimization of Cultural Conditions for Production of Exopolysaccharide by *Halomonas marina* HMA 103 under Batch-Culture. *American Journal of Microbiology*, 6 (2), 31-39. <https://doi.org/10.3844/ajmsp.2015.31.39>
7. **Basu B. (2022).** The radiophiles of Deinococcaceae family: Resourceful microbes for innovative biotechnological applications. *Current research in microbial sciences*, 3, 100153. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100153>.
8. **Bhandari, S., Poudel, D. K., Marahatha, R., Dawadi, S., Khadayat, K., Phuyal, S., Shrest, S., Gaire, S., Basnt, K, Khadka, U., Parajuli, N. (2021).** Microbial Enzymes Used in Bioremediation, *Journal of Chemistry*, 2021, 8849512, 17. <https://doi.org/10.1155/2021/8849512>.
9. **Biswas, J., & Paul, A. K. (2014).** Production of Extracellular Polymeric Substances by Halophilic Bacteria of Solar Salterns. *Chinese Journal of Biology*, 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/205731>.

Références Bibliographiques

10. **Boetius, A., Anesio, A. M., Deming, J. W., Mikucki, J. A., & Rapp, J. Z. (2015).** Microbial ecology of the cryosphere: sea ice and glacial habitats. *Nature reviews. Microbiology*, 13(11), 677–690. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3522>.
11. **Boutaiba, S., Hacène, H., Bidle, K. A., & Maupin-Furlow, J. A. (2011).** Microbial Diversity of the Hypersaline Sidi Ameur and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. *Journal of arid environments*, 75 (10), 909-916. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2011.04.010>.
12. **Bowers, K. J., Mesbah, N. M., & Wiegel, J. (2009).** Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life? *Saline Systems*, 23: 5-9. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-5-9>.
13. **DasSarma, S. & DasSarma, P. (2012).** Halophiles. In eLS, (John Wiley & Sons, Ltd), New York. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000394.pub4>.
14. **De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., & Whitman, W. B. (2009).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes. 2nd ed (Vol. 3). USA : Springer.
15. **Dohare, S., Rawat, H. K., Bhargava, Y., & Kango, N. (2024).** Characterization of Diesel Degrading Indigenous Bacterial Strains, *Acinetobacter pittii* and *Pseudomonas aeruginosa*, Isolated from Oil Contaminated Soils. *Indian journal of microbiology*, 64(2), 749–757. <https://doi.org/10.1007/s12088-024-01317-3>.
16. **Gomri, M.A., Bentaleb, A., Boucekrit, S., & Kharroub, K. (2021).** Isolation of thermophilic bacteria producing exopolysaccharides from the geothermal spring of Hammam Grouz (Mila, Algeria. *Algerian Journal of Nutrition and Food Sciences*, 1(4), 1–9. <https://fac.umc.edu.dz/inataa/revue/files/ajnfs0104001>.
17. **Gupta, G. N., Srivastava, S., Khare, S. K., & Prakash, V. (2014).** Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 7(2), 371-380. <https://doi.org/10.5958/2230-732X.2014.00258.7>.
18. **Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013).** A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, 2013, Article 329121, 18 p. <https://doi.org/10.1155/2013/329121>
19. **Haddar, A. (2011).** Alkaline proteases produced by *Bacillus licheniformis* RP1 grown on shrimp wastes: Application in chitin extraction, chicken feather-degradation and as a

- dehairing agent. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*.
<https://doi.org/10.1007/S12257-010-0410-7>.
20. **Hamid, B., Bashir, Z., Yattoo, A. M., Mohiddin, F., Majeed, N., Bansal, M., Poczai, P., Almalki, W. H., Sayyed, R. Z., Shati, A. A., & Alfaifi, M. Y. (2022).** Cold-Active Enzymes and Their Potential Industrial Applications—A Review. *Molecules*, 27(18), 5885.
<https://doi.org/10.3390/molecules27185885>.
 21. **Harirchi, S., Sar, T., Ramezani, M., Aliyu, H., Etemadifar, Z., Nojoumi, S. A., Yazdian, F., Awasthi, M. K., & Taherzadeh, M. J. (2022).** *Bacillales*: From Taxonomy to Biotechnological and Industrial Perspectives. *Microorganisms*, 10(12), 2355.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10122355>.
 22. **Health Protection Agency (2011).** Catalase Test. UK Standards for Microbiology Investigations. 8 Issue 2.2
 23. **Huang, X. F., Guan, W., Liu, J., Lu, L. J., Xu, J. C., & Zhou, Q. (2010).** Characterization and phylogenetic analysis of bio emulsifier producing bacteria. *Bioresource technology*, 101(1), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.086>.
 24. **Jayachandra, S. Y., Anil Kumar, S., Merley, D. P., & Sulochana, M. B. (2012).** Isolation and characterization of extreme halophilic bacterium *Salinicoccus* sp. JAS4 producing extracellular hydrolytic enzymes. *Recent Research in Science and Technology*. 4(4), 46-49.
 25. **Kanekar, P.P., Kanekar, S.P. (2022).** Xerophilic and Xerotolerant Microorganisms. In: Diversity and Biotechnology of Extremophilic Microorganisms from India. *Microorganisms for Sustainability*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-1573-4_10.
 26. **Karigar, C. S., & Rao, S. S. (2011).** Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme research*, 2011, 805187.
<https://doi.org/10.4061/2011/805187>.
 27. **Khalid, F. E., Lim, Z. S., Sabri, S., Gomez-Fuentes, C., Zulkharnain, A., & Ahmad, S. A. (2021).** Bioremediation of Diesel Contaminated Marine Water by Bacteria: A Review and Bibliometric Analysis. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(2), 155.
<https://doi.org/10.3390/jmse9020155>.
 28. **Kharroub, K., Quesada, T., Ferrer, R., Fuentes, S., Aguilera, M., Boulahrouf, A., Ramos-Cormenzana, A., & Monteoliva-Sánchez, M. (2006).** *Halorubrum ezzemoulense* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from Ezzemoul sabkha, Algeria.

- International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56 (7), 1583–1588.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.64272-0>.
29. **Kiplimo, D., Mugweru, J., Kituyi, S., Kipnyargis, A., & Mwirichia, R. (2019).** Diversity of esterase and lipase producing haloalkaliphilic bacteria from Lake Magadi in Kenya. *Journal of basic microbiology*, 59 (12), 1173–1184.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201900353>
 30. **Kumar, A., & Sharma, S. (2019).** “Microbes and enzymes in soil health and bioremediation,” in *Microorganisms for Sustainability* Springer, Berlin, Germany, 2019.
 31. **Kumar, S., Karan, R., Kapoor, S., S P, S., & S K, K. (2012).** Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Brazilian journal of microbiology*. 43(4), 1595–1603. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120004000044>.
 32. **Kumari, M., Karn, S.K., & Raj, V. (2024).** Extremophiles and related extremozymes: Their structure-function relationship in industrial applications. *Industrial Biotechnology*, 20(6), 279–295. <https://doi.org/10.1089/ind.2024.0029>
 33. **Kushvaha, R. P., Parihar, S. S., Singh, T. A., & Prakash, A. (2022).** Biodegradation of synthetic dyes by bacteria isolated from textile industry water effluent. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 46 56. <https://doi.org/10.9734/jabb/2022/v25i630289>.
 34. **Li, Z., Jiang, Y., Guengerich, F. P., Ma, L., Li, S., & Zhang, W. (2020).** Engineering cytochrome P450 enzyme systems for biomedical and biotechnological applications. *The Journal of biological chemistry*, 295(3), 833–849.
<https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.008758>.
 35. **Liu, L., Bilal, M., Duan, X., & Iqbal, H. M. N. (2019).** Mitigation of environmental pollution by genetically engineered bacteria - Current challenges and future perspectives. *The Science of the total environment*, 667, 444–454.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.390>.
 36. **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>.
 37. **Lu, Z. Y., Guo, X. J., Li, H., Huang, Z. Z., Lin, K. F., & Liu, Y. D. (2015).** Highthroughput screening for a moderately halophilic phenol-degrading strain and its salt tolerance response. *International journal of molecular sciences*, 16 (6), 11834–11848.
<https://doi.org/10.3390/ijms160611834>.

38. **MacElroy, R. D. (1974).** Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*, 6(1),74-75.
39. **Martínez-Espinosa R. M. (2024).** Halophilic archaea as tools for bioremediation technologies. *Applied microbiology and biotechnology*, 108(1), 401. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13241-z>.
40. **McComb, J., Alexander, T. C., Han, F. X., & Tchounwou, P. B. (2014).** Understanding Biogeochemical Cycling of Trace Elements and Heavy Metals in Estuarine Ecosystems. *Journal of bioremediation & biodegradation*, 5, 1000e148. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000e148>.
41. **Menasria, T., Monteoliva-Sánchez, M., Benammar, L., Benhadj, M., Ayachi, A., Hacène, H., Gonzalez-Paredes, A., & Aguilera, M. (2019).** Culturable halophilic bacteria inhabiting Algerian saline ecosystems: A source of promising features and potentialities. *World journal of microbiology and biotechnology*, 35 (9), 132. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2705-y>.
42. **Mesbah N. M. (2022).** Industrial Biotechnology Based on Enzymes From Extreme Environments. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10, 870083. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.870083>.
43. **Naghoni, A., Emtiazi, G., Amoozegar, M. A., Cretoiu, M. S., Stal, L. J., Etemadifar, Z., Shahzadeh Fazeli, S. A., & Bolhuis, H. (2017).** Microbial diversity in the hypersaline Lake Meyghan, Iran. *Scientific reports*, 7(1), 11522. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11585-3>.
44. **Narayanan, M., Ali, S. S., & El-Sheekh, M. (2023).** A comprehensive review on the potential of microbial enzymes in multipollutant bioremediation: Mechanisms, challenges, and future prospects. *Journal of environmental management*, 334, 117532. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117532>.
45. **Nas, F., Aissaoui, N., Mahjoubi, M., Mosbah, A., Arab, M., Abdelwahed, S., & Klouche-Khelil, N. (2021).** A comparative GC-MS analysis of bioactive secondary metabolites produced by halotolerant *Bacillus* spp. isolated from the Great Sebkha of Oran. *International Microbiology*, 24(3), 455–470. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00185-x>.
46. **Oren, A. (2006).** Life at High Salt Concentrations. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. 2:263-282. https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_9.

47. **Public Health England. (2014).** Oxidase Test. UK Standards for Microbiology Investigations. 26 Issue 2.3.
48. **Rahman, S. S., Siddique, R., & Tabassum, N. (2017).** Isolation and identification of halotolerant soil bacteria from coastal Patenga area. *BMC research notes*, 10 (1), 531. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2855-7>.
49. **Ramadoss, D., Lakkineni, V. K., Bose, P., Ali, S., & Annapurna, K. (2013).** Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *SpringerPlus*, 2(1), 6. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-6>
50. **Rawat, M., Chauhan, M., & Pandey, A. (2024).** Extremophiles and their expanding biotechnological applications. *Archives of microbiology*, 206(6), 247. <https://doi.org/10.1007/s00203-024-03981-x>.
51. **Reang, L., Bhatt, S., Tomar, R. S., Joshi, K., Padhiyar, S., Bhalani, H., Kheni, J., Vyas, U. M., & Parakhia, M. V. (2024).** Extremozymes and compatible solute production potential of halophilic and halotolerant bacteria isolated from crop rhizospheric soils of Southwest Saurashtra Gujarat. *Scientific reports*, 14(1), 15704. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63581-z>.
52. **Saibi, A. N. E., Nas, F., Arab, M., Aissaoui, N., Boukeroui, Y., & Klouche-Khelil, 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 (9), 816–831. <https://doi.org/10.1080/01490451.2022.2079777>.
53. **Salwan, R., & Sharma, V. (2020).** Overview of extremophiles. *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*. 3-11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00001-0>.
54. **Shraddha, R. S., Shekher, R., Sehgal, S., and Kamthania M. (2011).** Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications,” *Enzyme Research*, vol. 2011, pp. 1–11.
55. **Sigurgísladóttir, S., Konráðsdóttir, M., Jónsson, Á., Kristjánsson, J. K., & Matthiasson, E. (1993).** Lipase activity of thermophilic bacteria from Icelandic hot springs. *Biotechnology Letters*, 15(4), 361-366.
56. **Sinha, A., Sinha, R., Khare, S.K. (2014).** Heavy Metal Bioremediation and Nanoparticle Synthesis by Metallophiles. In: Parmar, N., Singh, A. (eds) *Geomicrobiology and Biogeochemistry. Soil Biology*, vol 39. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-41837-2_6.

57. **Sun, J., He, X., LE, Y., Al-Tohamy, R., & Ali, S. S. (2024).** Potential applications of extremophilic bacteria in the bioremediation of extreme environments contaminated with heavy metals. *Journal of environmental management*, 352, 120081. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120081>.
58. **Sysoev, M., Grötzinger, S. W., Renn, D., Eppinger, J., Rueping, M., & Karan, R. (2021).** Bioprospecting of Novel Extremozymes From Prokaryotes-The Advent of CultureIndependent Methods. *Frontiers in microbiology*, 12, 630013. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630013>.
59. **Thaz, C. J., Lavanya, B., Kumar, J. P., & Jayaraman, G. (2015).** Production and characterization of a halotolerant cellulase from *Bacillus aquimaris* VITP4 strain. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5, 412-424.
60. **Ventosa, A., de la Haba, R. R., Sánchez-Porro, C., & Papke, R. T. (2015).** Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. *Current opinion in microbiology*, 25, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.002>
61. **Wang, Y., Feng, Y., Cao, X., Liu, Y., & Xue, S. (2018).** Insights into the molecular mechanism of dehalogenation catalyzed by D-2-haloacid dehalogenase from crystal structures. *Scientific reports*, 8(1), 1454. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19050-x>.
62. **Yadav, A. N., & Saxena, A. K. (2018).** Biodiversity and biotechnological applications of halophilic microbes for sustainable agriculture. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 6 (1), 48-55.
63. **Zhao, D., Kumar, S., Zhou, J., Wang, R., Li, M., & Xiang, H. (2017).** Isolation and complete genome sequence of *Halorientalis hydrocarbonoclasticus* sp. nov., a hydrocarbon-degrading haloarchaeon. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 21(6), 1081–1090. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0968-5>.

Annexes

Composition des milieux de culture et solutions**Bouillon Nutritif (pH = 7,2 ± 0,2)**

Peptone	20 g
Extrait de levure	05 g
Chlorure de sodium	05 g
Eau distillée	1000 mL

Gélose Nutritive (pH = 6,8 à 7,4)

Peptone	05 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	02 g
Chlorure de sodium	05 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 mL

Milieu minimal (eau arwa) (pH = 7,63)

Calcium	120 mg
Magnesium	23 mg
Sodium	56 mg
Potassium	1mg
chlorures	100 mg
Bicarbonate	256 mg
Sulfates	104 mg
Nitrates	46.5 mg
Nitrites	< 0.01 mg
Résidu sec	450 mg

Gélose à amidon

Gélose nutritive	100 mL
Amidon	1g

Gélose à gélatine

Gélose Nutritive supplémentée de NaCl	100 mL
Cellulose	1 g

Gélose au lait

Lait écrémé poudre	10 g
Gélose Nutritive supplémentée de NaCl	100 mL

N. B. Au moment de l'utilisation, mettre la gélose nutritive en surfusion (45°C) et ajouter du lait stérile. Après agitation, le mélange est coulé sur boîte pétri.

Gélose à la cellulose

Gélose Nutritive supplémentée de NaCl	100 mL
Cellulose	1 g

Gélose au tween 80

Gélose Nutritive supplémentée de NaCl	100 mL
Tween 80	1 mL

Gélose à l'huile d'olive

Gélose Nutritive supplémentée de NaCl	100 mL
l'huile d'olive	2.5 mL

Gélose au jaune d'œuf

Gélose Nutritive supplémentée de NaCl	100 mL
Emulsion de jaune d'œuf	10 mL
Préparation de l'émulsion de jaune d'œuf	

Après avoir flamber la coquille avec de l'alcool pendant 30 secondes, récupérer le jaune d'œuf dans un bécher stérile et additionner aseptiquement 4 fois le volume en eau distillée stérile, mélanger rigoureusement puis mettre le mélange à l'étuve pendant 2 heures à 30°C et ensuite au réfrigérateur pendant 24 heures.

N. B. Au moment de l'utilisation, mettre la gélose nutritive en surfusion (45°C) et ajouter l'émulsion de jaune d'œuf, après séchage le milieu estensemencé.

Catalogue analytique de plaque API® 20^E

Tests	Composants actifs	Réactions - enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βDGalactopyranosidase)	Incolore	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine DiHydrolase	Jaune	rouge - orangé
LDC	L-lysine	Lysine DéCarboxylase	Jaune	rouge - orangé
ODC	L-ornithine	Ornithine DéCarboxylase	Jaune	rouge - orangé
CIT	trisodium citrate	utilisation du CITrate	vert pâle - jaune	bleu-vert - bleu
H ₂ S	sodium thiosulfate	production d'H ₂ S	incolore - grisâtre	dépôt noir - fin liseré
URE	Urée	UREase	Jaune	rouge - orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane DésAminase	TDA-immédiat Jaune Marron-rougeâtre	
IND	L-tryptophane	production d'INDole	JAMES-immédiat Incolore-vert pâle-jaune rose	
VP	sodium pyruvate	production d'acétoïne	VP 1 + VP 2 / 10 min incolore - rose pâle rose - rouge	
GEL	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase (GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	fermentation - oxydation (GLUcose)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
MAN	D-mannitol	fermentation – oxydation (MANnitrol)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
INO	Inositol	fermentation – oxydation (INOsitol)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
SOR	D-sorbitol	fermentation – oxydation (SORbitol)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
RHA	L-rhamnose	fermentation – oxydation (RHAmnose)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
SAC	D-saccharose	fermentation – oxydation (SACcharose)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
MEL	D-melibiose	fermentation – oxydation (MELibiose)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
AMY	Amygdaline	fermentation – oxydation (AMYgdaline)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
ARA	L-arabinose	fermentation – oxydation (ARAbinose)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris

ملخص

يمثل التلوث البيئي الناتج عن الأنشطة الصناعية والزراعية والحضرية إحدى المشكلات الرئيسية في الوقت الحاضر، وذلك بسبب تراكم العديد من الملوثات المستديمة، ولا سيما الهيدروكربونات والأصبغ الاصطناعية. وفي هذا السياق، تبرز المعالجة الحيوية كبديل بيئي ومستدام يعتمد على استخدام الكائنات الحية الدقيقة القادرة على تفكيك هذه الملوثات.

هدفت هذه الدراسة إلى البحث عن إنتاج الإنزيمات المشاركة في عمليات المعالجة الحيوية لدى سلالة بكتيرية محبة للظروف القاسية تحمل الرمز LMB3057، تم تحديدها على أنها تنتمي إلى جنس *Bacillus*، وغُزلت من مياه السيخة الكبرى لوهران. خضعت السلالة المعزولة للتوصيف الظاهري، حيث تبين أنها عصوية الشكل، موجبة لصبغة غرام، متحركة، وتُظهر نشاط إنزيمي الكاتالاز والأوكسيداز. كما أظهرت API 20E نمطًا أيضًا متنوعًا. وأوضحت الدراسة الفسيولوجية أن السلالة تتمتع بقدرة كبيرة على تحمل الظروف البيئية القاسية، إذ لوحظ نموها عند تراكيز من كلوريد الصوديوم تراوحت بين 0 و25٪، ودرجات حرارة تتراوح بين 25 و60 درجة مئوية، وقيم pH تتراوح بين 6 و9. وأظهر تقييم الإمكانات الإنزيمية للسلالة امتلاكها رصيدًا إنزيميًا واعدًا، حيث أنتجت إنزيمات الأميلاز، والسيلولاز، والكازيناز، والإستيراز، والليباز. وقد سُجلت هذه الأنشطة الإنزيمية سواء في غياب الملح أو في وجود تراكيز مرتفعة منه. كما بينت اختبارات المعالجة الحيوية قدرة السلالة LMB3057 على إزالة لون بعض الأصباغ الاصطناعية، خاصة أزرق الميثيلين وأحمر الكونغو. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت السلالة قدرة على النمو في وسط يحتوي على الديزل كمصدر وحيد للكربون والطاقة، مما يشير إلى قدرتها المحتملة على تحليل بعض الهيدروكربونات. وبناءً على هذه النتائج، يمكن اعتبار هذه السلالة والإنزيمات التي تنتجها مرشحين واعدين للعديد من التطبيقات البيوتكنولوجية.

الكلمات المفتاحية: الكائنات المحبة للظروف القاسية، الإنزيمات المتطرفة، المعالجة الحيوية، الأصباغ الاصطناعية، الديزل.

Abstract

Environmental pollution generated by industrial, agricultural, and urban activities has become a major concern due to the accumulation of persistent pollutants, particularly hydrocarbons and synthetic dyes. In this context, bioremediation has emerged as an environmentally friendly and sustainable alternative based on the use of microorganisms capable of degrading these contaminants.

The present study aimed to investigate the production of enzymes involved in bioremediation by an extremophilic bacterial strain designated LMB3057, identified as belonging to the genus *Bacillus* and isolated from the waters of the Great Sebkh of Oran.

The isolate was subjected to phenotypic characterization. It was found to be a Gram-positive, motile rod exhibiting both catalase and oxidase activities. The API 20E system revealed a diversified metabolic profile. The physiological characterization demonstrated that the strain exhibits a broad tolerance to extreme environmental conditions, with growth occurring at NaCl concentrations ranging from 0 to 25%, temperatures between 25 and 60°C, and pH values ranging from 6 to 9.

The evaluation of its enzymatic potential revealed a promising enzymatic repertoire. The isolate produced amylase, cellulase, caseinase, esterase, lecithinase, and lipase. These enzymatic activities were observed both in the absence and presence of high salt concentrations.

Furthermore, bioremediation assays demonstrated the ability of strain LMB3057 to decolorize certain synthetic dyes, particularly methylene blue and Congo red. The strain also showed the ability to grow in a medium containing diesel as the sole source of carbon and energy, suggesting its potential capability to degrade certain hydrocarbons. This isolate and its enzymes may therefore represent promising candidates for various biotechnological applications.

Keywords : Extremophiles; extremoenzymes; bioremediation; synthetic dyes; diesel.

Résumé

La pollution environnementale générée par les activités industrielles, agricoles et urbaines constitue aujourd'hui une problématique majeure en raison de l'accumulation de nombreux polluants persistants, notamment les hydrocarbures et les colorants synthétiques. Dans ce contexte, la bioremédiation apparaît comme une alternative écologique et durable reposant sur l'utilisation de microorganismes capables de dégrader ces contaminants. Le présent travail vise à rechercher la production d'enzymes impliquées dans la bioremédiation chez une souche bactérienne extrémophile, désignée LMB3057 et identifiée comme appartenant au genre *Bacillus*, isolée à partir des eaux de la Grande Sebkh d'Oran.

L'isolat a été soumis à une caractérisation phénotypique. Il se présente sous forme de bâtonnet à Gram positif, mobile, et possédant une catalase et oxydase. La galerie API 20E a révélé un métabolisme diversifié. L'étude des paramètres physiologiques a montré que la souche présente une large tolérance aux conditions environnementales extrêmes, avec une croissance observée à des concentrations en NaCl comprises entre 0 et 25 %, des températures variant de 25 à 60 °C et des valeurs de pH comprises entre 6 et 9.

L'évaluation du potentiel enzymatique a mis en évidence un bagage enzymatique prometteur. L'isolat produit l'amylase, la cellulase, la caséinase, l'estérase, la lécithinase et la lipase. Ces activités enzymatiques ont été observées aussi bien en absence qu'en présence de fortes concentrations en sel.

Par ailleurs, les essais de bioremédiation ont montré la capacité de la souche LMB3057 à décolorer certains colorants synthétiques, notamment le bleu de méthylène et le rouge Congo. La souche a également démontré sa capacité à se développer sur un milieu contenant le diesel comme seule source de carbone et d'énergie, suggérant son aptitude potentielle à dégrader certains hydrocarbures. Cet isolat ainsi que ses enzymes peuvent constituer des candidats prometteurs pour diverses applications biotechnologiques.

Mots-clés : Extrémophiles, extrêmoenzymes, bioremédiation, colorants synthétiques, diesel.