

Biodiversité des bactéries halophiles modérées productrices d'enzymes hydrolytiques extracellulaires

Naïma BOUM'HANDI^{1*}, Fayssal ELFILALI¹, Brahim BOUALOUCH², Said HANOUNE¹,
Mouna MIRI³ et Abdessamad EL BARKAOU¹

¹ *Laboratoire de Bactériologie Alimentaire, Centre Spécialisé de Valorisation et de Technologie des Produits de la Mer, Institut National de Recherche Halieutique, BP 1050 Agadir, Maroc*

² *Laboratoire de Microbiologie, Pharmacologie et Biotechnologie, Faculté des Sciences Ain Chock, Université Hassan II, BP 5366 Casablanca, Maroc*

³ *Laboratoire Ecosystèmes Aquatiques Marins et Continentaux, Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr, BP 8106 Agadir, Maroc*

* Correspondance, courriel : nboumhandi@yahoo.fr

Résumé

L'étude de la biodiversité des bactéries halophiles dans un milieu hyper salin situé au sud du Maroc, a permis l'isolement de 205 souches provenant d'eau et de sédiments prélevés au niveau des salines de Tarfaya. 84 isolats sur les 205 étudiés sont considérés comme étant des bactéries halophiles modérées et halotolérantes, pour la plus part des Gram positif. L'identification biochimique par galeries API System a révélé la présence de 9 genres et de 18 espèces différentes pour la plupart d'origine environnementale. Les bactéries Gram positif sont dominées par le genre *Staphylococcus* (30,95 %) et les bactéries à Gram négatif dominées par les genres *Enterobacter* (25,92 %) et *Pseudomonas* (18,51 %). Les bactéries isolées, se sont avérées porteuses d'énorme potentiel biotechnologique. Leur caractérisation a permis de mettre en évidence leur capacité à s'adapter à d'autres conditions extrême outre que le sel : 64,28 % thermophiles halophiles, 17,85 % psychrophiles halophiles, 88,09 % acidophiles halophiles et 33,33 % alcalophiles halophiles et à produire des enzymes hydrolytiques : 51,19 % produisent des cellulases, 40,46 % des amylases, 27,38 % des protéases, 22,61 % des DNases, 20,23 % des lipases et 71,42 % possédant des activités hydrolytiques combinées.

Mots-clés : *extremophiles, halophiles, enzymes hydrolytiques, screening.*

Abstract

Biodiversity of moderate halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes

The study of the biodiversity of halophilic bacteria in a hyper-saline area located in the south of Morocco, allowed the isolation of 205 strains from water and sediments taken from the salts of Tarfaya. 84 isolates out of 205 isolates were studied, the bacteria were considered to be moderate and halotolerant halophilic bacteria, for the pus share of Gram-positive. The biochemical identification by galleries API System revealed the presence of 9 genera and 18 different species, most of them environmental origin. Gram-positive bacteria are dominated by the genus *Staphylococcus* (30.95 %) and Gram-negative bacteria dominated by the genera

Enterobacter (25.92 %) and Pseudomonas (18.51 %). The isolated bacteria have been shown to have enormous biotechnological potential. Their characterization made it possible to demonstrate their ability to adapt to other extreme conditions besides salt : 64.28 % halophilic thermophiles, 17.85 % halophilic psychrophiles, 88.09 % halophilic acidophiles and 33.33 % Alkalophiles and producing hydrolytic enzymes: 51.19 % produced cellulases, 40.46 % of the amylases, 27.38 % of the proteases, 22.61 % of the DNases, 20.23 % of the lipases and 71.42 % combined Hydrolytic activities.

Keywords : *extremophiles, halophiles, hydrolytic enzymes, screening.*

1. Introduction

La grande diversité métabolique des bactéries halophiles et halotolérantes isolées à partir des milieux hypersalins, leur confère un potentiel biotechnologique largement exploré depuis quelques années. Ainsi, certaines d'entre elles produisent des protéines halophiles utiles dans les transformations spécifiques, d'autres des produits comme les solutés compatibles et les polymères à grand intérêt dans différentes industries. De plus, ces microorganismes pourraient être utilisés dans des procédés de bioremédiation de l'environnement, ainsi que moyens de lutte biologique contre certains microorganismes phytopathogènes [1, 2]. La biocatalyse industrielle a trouvé dans les microorganismes halophiles une source d'enzymes ayant de nouvelles propriétés [3, 4]. Différentes enzymes produites par des microorganismes halophiles et halotolérants isolés des sols salés, ont été décrites et un certain nombre de nouvelles possibilités pour les procédés industriels ont vu le jour en raison de leur stabilité à des concentrations salines élevées [5]. Ainsi, ces enzymes pourraient être utilisées dans des procédés industriels complexes tels que les processus de transformation des aliments, de biosynthèse et de lavage [3, 6]. Les enzymes halophiles qui généralement de types hydrolases sont actives et stables à des concentrations de sel élevées et plusieurs d'entre elles sont thermotolérantes et alcalophiles et sont dites polyextrêmophiles [7].

Ces propriétés rendraient ces enzymes halophiles attrayantes pour différentes applications biotechnologiques puisqu'elles seraient capables de catalyser des réactions dans des conditions difficiles, spécifiques à de nombreux processus industriels [8, 9]. Ces hydrolases, capables de décomposer différents polymères, constituent un groupe à haut intérêt biotechnologique : des amylases, des lipases, des DNases et des protéases produites par plusieurs bactéries halophiles isolées de milieux salins ont été rapportées, certaines montrent une forte dépendance au sel pour leur activité [4, 10]. Les milieux hypersalins sont nombreux au Maroc, plusieurs d'entre eux sont considérés comme zones humides et classés sites Ramsar. De nombreuses études ont porté sur ces milieux mettant en avant leur diversité faunistique et floristique. Cependant, les études des milieux hypersalins de point de vue diversité microbienne restent limitées. La thématique ainsi proposée nous permettra de construire une base de données sur les bactéries halophiles d'origine marine au Maroc tout en recherchant d'éventuelles potentialités en vue d'applications biotechnologiques. Pour cela nous nous sommes fixés comme objectif global l'étude de la diversité des bactéries marines halophiles des marais salants en l'occurrence celles de Tarfaya situées au niveau de la côte atlantique sud du Maroc et comme objectifs spécifiques, l'isolement, la caractérisation et la recherche de potentiel biotechnologique des isolats par la mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires.

2. Matériel et méthodes

2-1. Échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé durant le mois de mars 2016 au niveau de trois sites salins situés au niveau des marais salants de Tazgha- Région de Tarfaya (27°56'N, 12°55'W). Les prélèvements des échantillons d'eau et de sédiments ont été effectués dans des flacons stériles. Les échantillons de sédiment correspondent aux trois premiers centimètres à la surface des sédiments. Les prélèvements sont ensuite transportés au laboratoire dans une glacière et conservés à + 4°C. La température et la salinité sont mesurées sur place respectivement à l'aide d'un thermomètre numérique et d'un salinomètre de terrain. Le pH est mesuré une fois arrivé au laboratoire à l'aide d'un pH mètre étalonné.

2-2. Isolement et dénombrement des bactéries halophiles

L'isolement bactérien à partir des dilutions sériées préparées en eau salée à 5 % de NaCl, est effectué par ensemencement sur milieux Columbia (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) contenant cinq concentrations de NaCl (2 %, 3 %, 5 %, 10 % et 20 %). L'incubation des boîtes à 30°C pendant 24 h est faite en conditions d'aérobiose. Le nombre de bactéries est exprimé en UFC/mL (Unité Formant Colonie/mL) ramené à UFC/g.

2-3. Caractérisation phénotypique

L'étude microscopique, les caractères culturaux et l'étude enzymatique de recherche de catalase et oxydase ont été déterminés par méthodes standards [11]. La recherche des caractères biochimiques a été effectuée par systèmes API en se basant sur la forme, le Gram et les résultats des tests de catalase et d'oxydase. Une répartition des bactéries en groupe a été faite pour choisir le type de galeries API (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) à utiliser :

- Galerie API 20E (REF 20 100) pour identification des bacilles à Gram négatif oxydase négative de type entérobactéries [12] ;
- Galerie API 20NE (REF 20 050) pour identification des bacilles à Gram négatif oxydase positive de type non entérobactéries ;
- Galerie API STREP (REF. 20 600) pour identification des Streptocoques, Cocci Gram +, Catalase négative ;
- Galerie API STAPH (REF 20 500) pour identification des Staphylocoques, Cocci Gram +, Catalase positive [13] ;
- Galeries API 50CH (REF 50 300) et API Listeria (REF 20 900) pour identification des Bacilles Gram+.

Les galeries ont été inoculées suivant les recommandations du fabricant et incubées à une température de 30°C au moins pendant 24h. La lecture des galeries a été effectuée par utilisation du logiciel API Web qui permet l'identification des microorganismes en se basant sur la base de données du fabricant. Les résultats reposent sur le principe de l'identification numérique et les noms obtenus par API sont accompagnés d'un pourcentage d'identification.

2-4. Caractérisation physiologiques

L'halo tolérance des isolats est testée par ensemencement sur gélose Columbia à pH 7,5 additionnée de différentes concentrations en NaCl : 5 %, 10 %, 15 % et 20 %. Les cultures sont incubées en conditions d'aérobies à 30°C pendant 72h. L'alcali tolérance des isolats est estimée par ensemencement de chaque isolat sur gélose Columbia à pH 4,5 ; 7,5 et 9,2 additionnée de NaCl à 5 % et incubé à 30°C pendant 72h. L'habilité

à croître aux différentes températures est évaluée par ensemencement de chaque isolat sur gélose Columbia à pH 7,5 additionnée de NaCl à 5 % et incubé à 10°C, 30°C et 50°C. La croissance bactérienne est déterminée par observation visuelle.

2-5. Production d'enzymes

2-5-1. Protéases

L'activité protéolytique des isolats a été révélée dans un milieu TSA (Difco, Détroit, USA) salé contenant 50% de lait écrémé, 5% de NaCl (w/v), 0,5% d'extrait de levure et 1% de peptone additionné de 20 g/L d'agar [2].

2-5-2. Amylases

La présence de l'activité amylolytique sur boîte a été déterminée par inondation des cultures sur TSA contenant 0,5 % (w/v) d'amidon soluble et 5 % de NaCl, avec une solution de lugol (RéactifvRal- Martillac- France). L'apparition de zones claires autour des colonies montre une hydrolyse d'amidon [14].

2-5-3. Lipases

L'activité lipolytique des isolats a été détectée par la révélation de zones d'hydrolyse autour des colonies poussant sur du TSA additionné de 1 % de Tween 80 (w/v) [15].

2-5-4. DNases

L'activité DNase des isolats testés a été révélée sur DNA agar (Biomérieux, Lyon, France) additionné de 5 % de NaCl (w/v). Après 7 jours d'incubation les boîtes sont inondées par une solution de HCl à 1N, les halos autour des colonies montrent l'activité DNase [16].

2-5-5. Cellulases

L'activité cellulosique des isolats a été mise en évidence par inondation des cultures de 48h sur milieu TSA à 1 % de cellulose (incubation à 30°C) par une solution de rouge de Congo (Panreac- Barcelona- Espana) à 1 mg/mL pendant 15 min puis d'une solution de NaCl à 1M pendant 15 min [2].

3. Résultats

3-1. Paramètres physico-chimiques des sites d'étude

La valeur moyenne de la concentration en sel varie de 120 à 180 g/l. Le pH moyen de 6,84 à 8,21 et la température moyenne de 15,5 à 18°C (*Tableau 1*). Ainsi, selon la classification des eaux salines, les marais salants de Tazgha de la région de Tarfaya pourraient être considérés comme biotope 3 car elles sont caractérisées par des concentrations en sel dépassant les 100 g/L [17]. Le pH légèrement alcalin des sédiments (pH 7,83 à 8,21) serait dû probablement à la présence du gypse. L'action conjuguée d'un climat caractérisé par une évaporation intense et la présence d'une nappe peu profonde fait que la plupart des sols ont subi le phénomène de salinisation secondaire.

Tableau 1 : Paramètres physico-chimiques et charge bactérienne des échantillons analysés

| | Site 1 | | Site 2 | | Site 3 | |
|------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| | Sédiment | Eau | Sédiment | Eau | Sédiment | Eau |
| pH | 8.21* | 7.19* | 7.93* | 7.04* | 7.83* | 6.84* |
| Température (°C) | 16* | 15.5* | 17* | 16* | 17.7* | 18* |
| Salinité (g/L) | nd | 180* | nd | 160* | nd | 120* |
| UFC/g ou mL | 5 10 ⁷ * | 1.3 10 ⁶ * | 5 10 ⁷ * | 10 ⁵ * | 10 ⁸ * | 3 10 ⁵ * |

**Valeurs moyennes*

3-2. Isolement bactérien

Les bactéries halophiles sont présentes dans tous les échantillons d'eau et de sédiments prélevés et analysés. Le comptage sur boîte exprimé en UFC (unités formant colonies) a permis d'estimer la charge bactérienne. Le nombre des bactéries hétérotrophes aérobies ou anaérobies facultatives qui se sont développées sur le milieu Columbia Agar à différentes concentrations de NaCl, varie de 10⁵ à 10⁸ UFC/g ou mL (*Tableau 1*). Le criblage des microorganismes halophiles à partir des échantillons d'eau et de sédiments des trois sites étudiés a permis l'isolement de 205 isolats. Pour la suite de notre étude, 84 isolats ont été retenus en se basant sur les différences macroscopiques et microscopiques des souches soit : 19 souches isolées à partir d'eau de mer et 65 à partir de sédiment.

3-3. Caractérisation phénotypique

3-3-1. Analyses macroscopiques

Jusqu'à une dilution de 10⁻⁷, un total de 65 isolats bactériens cultivables montrant des différences macroscopiques a été obtenu à partir des sédiments. 38 isolats (58,46 %) présentent une pigmentation crème, les autres (41,54 %) forment des pigmentations jaunes ou jaunes verdâtres sur Columbia Agar à différentes concentrations de sel. Tandis que pour une dilution jusque à 10⁻⁴, un total de 19 isolats bactériens a été obtenu à partir de l'eau de mer. 10 isolats (52,63 %) présentent une pigmentation crème, les autres (47,37 %) forment des pigmentations jaunes, jaune verdâtre ou vertes sur Columbia Agar à différentes concentrations de sel.

3-3-2. Analyses microscopiques

Sur les 84 isolats, 53 (63,09 %) sont Gram positif alors que 31 (36,90 %) sont à Gram négatif. La plupart des isolats (62,35 %) sont catalase positive et oxydase négative. Tous les isolats se sont développés en conditions d'aérobies sur Columbia à 5 % de NaCl pendant 24 à 48h à une température d'incubation de 30°C et à pH 7,5.

3-3-3. Analyses biochimiques par galeries API System

Les analyses biochimiques par galeries API System n'ont porté que sur les isolats ayant révélé une activité enzymatique extracellulaire. L'identification biochimique par galeries API System a révélé la présence de 9 genres différents pour la plupart d'origine environnementale : *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Kocuria*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Pasteurella*, *Moraxella* et *Enterococcus*. Les bactéries Gram positif sont dominées par le genre *Staphylococcus* (30,95 %), reportés comme suit : *S. haemolyticus* (3 isolats), *S. warneri* (3 isolats), *S. cohnii cohnii* (2 isolats), *Staphylococcus spp* (2 isolats), *S. sciurii* (1 isolat), *S. chromogenes* (1 isolat) et *S. epidermidis* (1 isolat). Pour les bactéries à Gram négatif dominées par les genres *Enterobacter*

(25,92 %) et *Pseudomonas* (18,51 %), elles ont été assignées respectivement à *E. cloacae* (7 isolats), *P. fluorescens* (3 isolats), *P. aeruginosa* (1 isolat) et *P. luteola* (1 isolat) (**Tableau 3**). Ces résultats permettent de conclure qu'en se basant sur le système galerie API, nous avons identifié biochimiquement plus que la moitié (53,62 %) des bactéries halophiles productrices d'enzymes extracellulaires isolées des marais salants de Tarfaya. Néanmoins, ces bactéries nécessitent une caractérisation physiologique, ce qui nous a amené à étudier l'impact de la concentration en sel, du pH et de la température sur la croissance de ces bactéries.

3-4. Caractérisation physiologique

Les bactéries halophiles isolées des milieux salins de Tarfaya présentent des particularités et sont capables de tolérer des conditions extrêmes de croissance. La croissance des espèces identifiées a été testée sur milieu Columbia Agar contenant de 5 à 20 % de NaCl, à pH compris entre 4,5 et 9,2 et à des températures allant de 10 à 50°C.

3-4-1. Concentration en NaCl

Tous les isolats poussent à des concentrations de NaCl de 5 %. Sur les 84 isolats, 68 (80,95 %) tolèrent des concentrations de 10 % de NaCl, 52 (61,9 %) une concentration de 15 % et seulement 10 (11,90 %) une concentration de 20 % de NaCl identifiés comme étant des *Staphylococcus cohnii cohnii* (2 isolats) ; *S. haemolyticus* (3 isolats) ; *S. warneri* (3 isolats) et *Moraxella spp* (2 souches) (**Figure 1 et Tableau 2**).

3-4-2. Température

Tous les isolats ont une température optimale de 30°C. Sur les 84 isolats, 54 (64,28 %) sont capables de croître à une température de 50°C. Cependant, seulement 15 (17,85 %) tolèrent une température de 10°C parmi eux 13 ont été identifiés comme étant des *Enterobacter chloacae* (4 isolats) ; *Kocuria spp* (3 isolats) ; *Moraxella spp* (2 isolats) ; *Bacillus megaterium* (1 isolat) ; *Staphylococcus haemolyticus* (1 isolat) et *Stenophomonas maltophilia* (1 isolat) (**Figure 1 et Tableau 2**).

3-4-3. pH

Tous les isolats étudiés tolèrent un pH de 7,5. Sur les 84 isolats, 74 (88,09 %) sont capables de pousser à pH de 4,5. Cependant, 56 (66,66 %) des isolats représentés par *Enterobacter chloacae* (4), *Pseudomonas fluorescens* (3), *P. aeruginosa* (1), *P. luteola* (1), *Staphylococcus epidermidis* (1) et *Enterococcus spp* (1) ne tolèrent pas un pH de 9,2 (**Figure 1 et Tableau 2**).

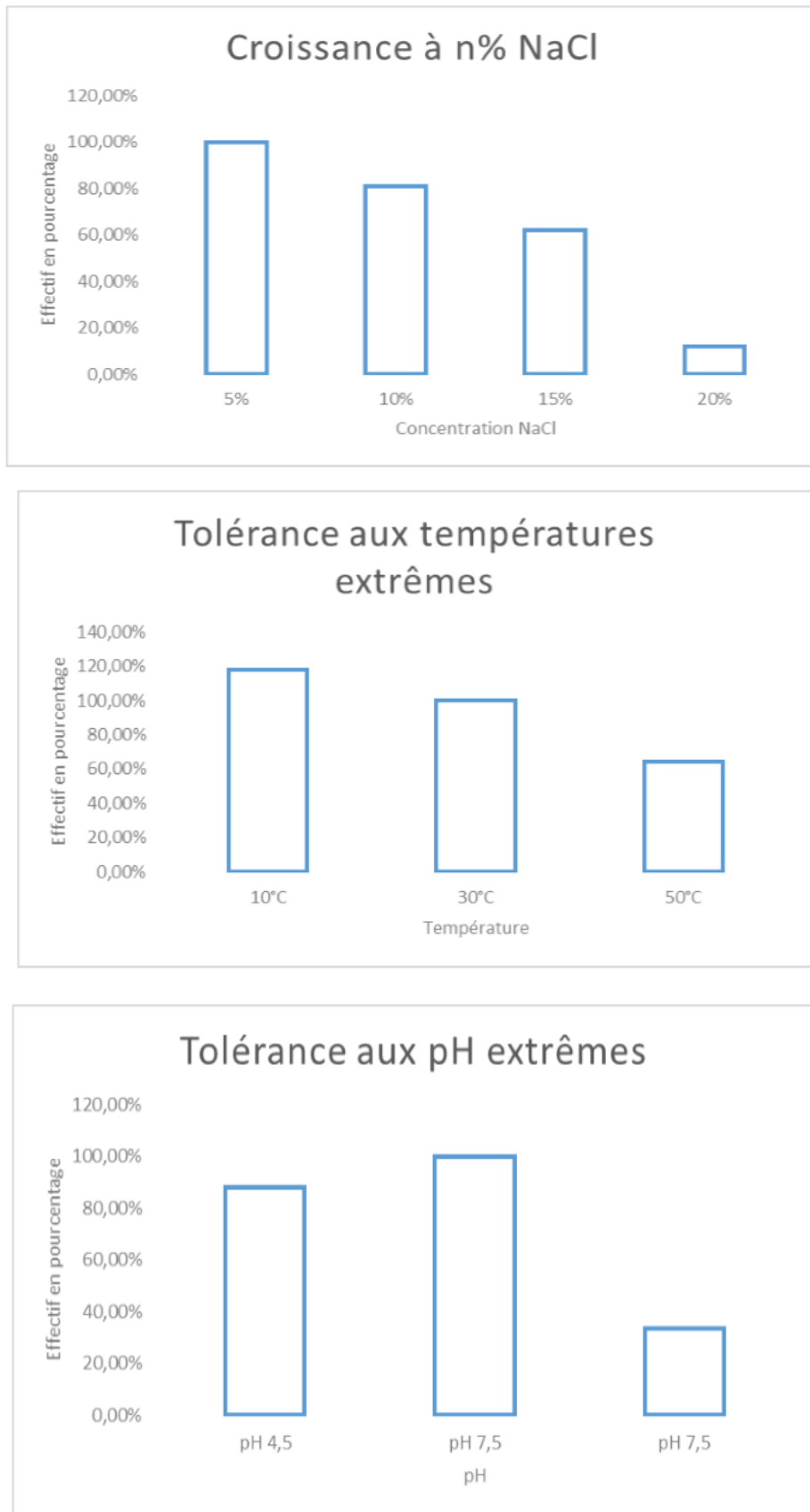


Figure 1 : Tolérance aux différentes concentrations en NaCl, températures et pH extrêmes des bactéries halophiles des salines de Tazhra (Région de Tarfaya)

Tableau 2 : Croissance des bactéries halophiles identifiées à différentes conditions physico chimiques

| Espèce identifiée (Nombre) | N° d'isolat | NaCl (w/v) | | | | pH | | | Température (°C) | | |
|--|-------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|----|----|
| | | 5% | 10% | 15% | 20% | 4,5 | 7,5 | 9,2 | 10 | 30 | 50 |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (3) | TC-93 | ++ | ++ | + | w | ++ | ++ | + | + | ++ | + |
| | TC-100 | ++ | + | + | w | ++ | ++ | + | - | ++ | + |
| | TT-20 | ++ | ++ | + | w | ++ | ++ | + | - | ++ | + |
| <i>S. warneri</i> (3) | TC-72 | ++ | ++ | + | w | ++ | ++ | + | - | ++ | + |
| | TT-91 | + | + | + | w | ++ | ++ | + | - | ++ | + |
| | TT-95 | ++ | + | + | w | ++ | ++ | + | - | ++ | + |
| <i>S. cohnii cohnii</i> (2) | TC-90 | ++ | ++ | + | + | ++ | ++ | + | - | ++ | + |
| | TC-91 | + | + | + | + | ++ | ++ | ++ | - | ++ | w |
| <i>Staphylococcus spp</i> (2) | TC-67 | ++ | + | w | - | ++ | ++ | + | - | ++ | + |
| | TC-79 | ++ | ++ | + | - | ++ | ++ | + | - | ++ | + |
| <i>S. chromogenes</i> (1) | TT-53 | ++ | ++ | + | - | ++ | ++ | + | - | ++ | + |
| <i>S. epidermidis</i> (1) | TT-99 | ++ | + | + | - | ++ | ++ | - | - | ++ | w |
| <i>S. sciuri</i> (1) | TC-82 | ++ | ++ | + | - | ++ | ++ | + | - | ++ | ++ |
| <i>Kocuria spp</i> (4) | TT-67 | ++ | ++ | + | - | ++ | ++ | ++ | - | ++ | ++ |
| | TT-71 | ++ | ++ | + | - | + | ++ | + | + | ++ | ++ |
| | TT-102 | ++ | ++ | + | - | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ |
| | TC-73 | ++ | ++ | + | - | + | ++ | + | + | ++ | ++ |
| <i>Bacillus cereus</i> (1) | TT-92 | ++ | - | - | - | - | + | + | - | ++ | - |
| <i>B. megaterium</i> (1) | TC-78 | ++ | - | - | - | - | ++ | ++ | + | ++ | w |
| <i>Enterobacter chloacae</i> (7) | TC-4 | ++ | + | w | - | + | ++ | - | + | ++ | w |
| | TC-5 | ++ | w | - | - | + | ++ | - | - | ++ | - |
| | TC-33 | ++ | + | + | - | + | ++ | - | - | ++ | w |
| | TC-56 | ++ | + | w | - | + | ++ | - | + | ++ | w |
| | TC-58 | + | w | - | - | w | ++ | w | + | ++ | w |
| | TC-66 | ++ | + | + | - | ++ | ++ | w | + | ++ | w |
| | TT-18 | ++ | w | - | - | + | ++ | w | + | ++ | w |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (3) | TC-34 | ++ | - | - | - | + | ++ | - | - | ++ | w |
| | TC-35 | ++ | - | - | - | + | ++ | - | - | ++ | - |
| | TC-36 | ++ | w | - | - | + | ++ | - | - | ++ | w |
| <i>P. aeruginosa</i> (1) | TC-40 | ++ | - | - | - | + | ++ | - | - | ++ | w |
| <i>P. luteola</i> (1) | TC-68 | ++ | + | + | - | + | ++ | - | - | ++ | + |
| <i>Stenophomonas maltophilia</i> (2) | TC-83 | ++ | ++ | + | - | w | ++ | + | - | ++ | ++ |
| | TT-64 | ++ | ++ | + | - | ++ | ++ | ++ | + | ++ | w |
| <i>Moraxella spp</i> (2) | TC-84 | ++ | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ | + | ++ | + |
| | TT-65 | ++ | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ | + | ++ | w |
| <i>Pasteurella spp</i> (1) | TC-81 | ++ | ++ | + | - | ++ | ++ | ++ | - | ++ | w |
| <i>Enterococcus spp</i> (1) | TC-6 | + | w | - | - | + | ++ | - | - | ++ | - |

Symboles. + : croissance positive ; w : croissance faible ; - : pas de croissance

3-5. Production d'enzymes extracellulaires

Chacun des 84 isolats obtenus a été placé dans des milieux contenant différents substrats pour la mise en évidence d'activités amylolytique, lipolytique, protéolytique ainsi que la production de DNase et de cellulase. Sur les 84 isolats obtenus, 71 (84,52 %) ont montré au moins une activité hydrolytique. 43 (51,19 %) produisent des cellulases, 34 (40,46 %) des amylases, 23 (27,38 %) des protéases, 19 (22,61 %) de DNases et 17 (20,23 %) de Lipases (**Figure 2**). Sur les 37 souches identifiées, 2 ont montré quatre activités hydrolytiques combinées et ont été identifiées respectivement comme *Bacillus megaterium* et *Moraxella spp*. 5 souches ont montré trois activités combinées et ont été identifiées comme étant : *Kocuria kristinae* (4) et *Staphylococcus sciuri* (1). 29 souches sont capables de produire deux enzymes extracellulaires et ont été identifiées comme étant : *Staphylococcus spp* (2), *Staphylococcus cohnii cohnii* (2), *Staphylococcus haemolyticus* (3), *Staphylococcus chromogenes* (1), *Staphylococcus warneri* (3), *Staphylococcus epidermidis* (1), *Bacillus cereus* (1), *Enterobacter chloacae* (7), *Pseudomonas fluorescens* (3), *Pseudomonas aeruginosa* (1) *Pseudomonas luteola* (1), *Stenophomonas maltophilia* (2), *Enterococcus spp* (1) et *Pasteurella spp* (1) (**Tableau 3**).

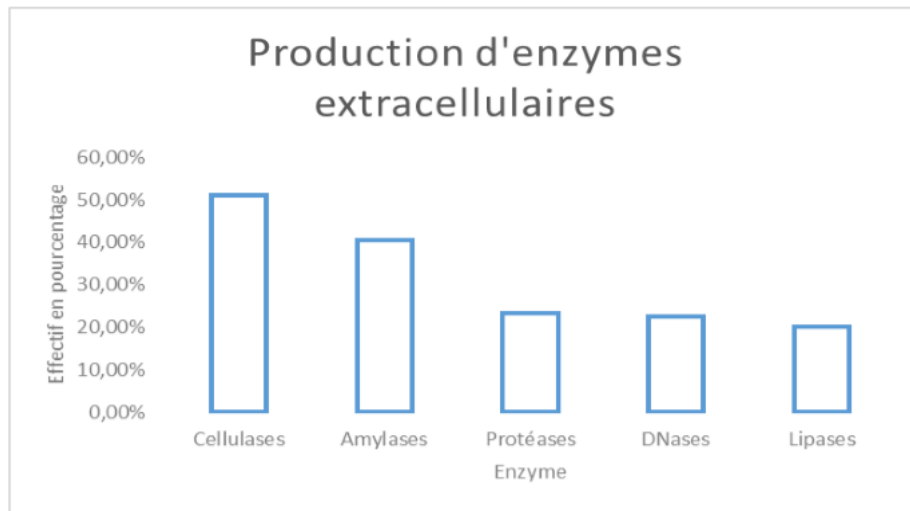


Figure 2 : Production d'enzymes extracellulaires chez les bactéries halophiles des salines de Tazgha (Région de Tarfaya)

Tableau 3 : Activités des exo enzymes hydrolytiques des espèces d'halophiles modérées identifiées

| Espèces (Nombre de souches) | Nombre de souches | Activité hydrolytique | | | | |
|---|-------------------|-----------------------|----------|-----------|--------|---------|
| | | Cellulases | Amylases | Protéases | DNases | Lipases |
| Gram- positif (20) | | | | | | |
| <i>Staphylococcus sciuri</i> (1) | 1 | ++ | +++ | - | +++ | - |
| <i>Staphylococcus spp</i> (2) | 1 | ++ | - | - | - | + |
| | 1 | +++ | - | ++ | - | - |
| <i>Staphylococcus cohnii cohnii</i> (2) | 1 | +++ | - | - | - | + |
| | 1 | + | - | - | - | + |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (3) | 2 | +++ | - | ++ | - | - |
| | 1 | ++ | - | +++ | - | - |
| <i>Staphylococcus chromogenes</i> (1) | 1 | ++ | - | +++ | - | - |
| <i>Staphylococcus warneri</i> (3) | 2 | +++ | - | - | - | + |
| | 1 | ++ | - | - | - | + |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> (1) | 1 | + | - | - | - | +++ |
| <i>Kocuria kristinae</i> (4) | 2 | ++ | ++ | - | +++ | - |
| | 1 | + | ++ | - | +++ | - |
| <i>Kocuria kristinae</i> (4) | 1 | + | ++ | - | ++ | - |
| | 1 | + | ++ | - | ++ | - |
| <i>Bacillus megaterium</i> (1) | 1 | + | + | + | + | - |
| <i>Bacillus cereus</i> (1) | 1 | - | + | + | - | - |
| <i>Enterococcus spp</i> (1) | 1 | - | - | ++ | - | + |
| Gram- négatif (17) | | | | | | |
| <i>Moraxella spp</i> (2) | 1 | ++ | +++ | - | +++ | + |
| | 1 | + | ++ | - | + | + |
| | 3 | ++ | ++ | - | - | - |
| <i>Enterobacter chloacae</i> (7) | 2 | - | + | +++ | - | - |
| | 2 | + | - | ++ | - | - |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (3) | 3 | ++ | - | - | - | + |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1) | 1 | +++ | - | - | - | ++ |
| <i>Pseudomonas luteola</i> (1) | 1 | +++ | - | - | - | + |
| <i>Stenophomonas maltophilia</i> (2) | 1 | - | + | - | +++ | - |
| | 1 | - | ++ | - | ++ | - |
| <i>Pasteurella spp</i> (1) | 1 | ++ | - | ++ | - | - |

Symboles. + : Production d'exoenzymes ; ++ ou +++ : forte production ; - : pas de production.

4. Discussion

4-1. Conditions de culture

Les bactéries halophiles sont présentes dans tous les échantillons d'eau et de sédiments prélevés. Le comptage fait sur milieu Columbia additionnés de sel montre que la charge bactérienne varie de 10^5 à 10^8 UFC/g ou mL. Ces résultats concordent avec ceux rapportés dans des études antérieures faites au niveau d'écosystèmes hypersalins [18, 19]. Dans cette étude, 9 genres et 18 espèces ont pu être répertoriés, certaines espèces sont représentées par un seul isolat ; ce qui témoigne d'une grande diversité des bactéries isolées des eaux et sédiments des marais salants de Tarfaya. L'étude macroscopique des caractères culturaux sur milieux Columbia Agar additionnés de sel a permis d'observer des colonies présentant des tailles, formes, pigmentations et aspects très différents. Néanmoins, il est très important de signaler que les conditions de culture choisies ont conditionné cette biodiversité et nous pouvons supposer que dans d'autres conditions (milieux de culture et températures d'incubation variés), la diversité aurait été encore plus grande [20].

4-2. Diversité microbienne et distribution des bactéries halophiles

L'analyse phénotypique des isolats a montré que les bactéries cultivables isolées d'eaux et des sédiments des milieux hypersalins de Tarfaya sont dominées par les bactéries à Gram positif. L'utilisation des galeries API comme outil d'identification des bactéries halophiles, nous a permis l'identification au niveau de l'espèce de 37 (53,62 %) isolats sur les 69 révélés producteurs d'enzymes hydrolytiques. En se basant sur les résultats obtenus, nous pouvons distinguer les quatre espèces dominantes identifiées comme étant *Enterobacter chloacae* (7 isolats), *Kocuria spp* (4 isolats), *Staphylococcus haemolyticus* (3 isolats), *Staphylococcus warneri* (3 isolats) et *Pseudomonas fluorescens* (3 isolats). Néanmoins, quelques différences physiologiques existent entre les souches appartenant à la même espèce, telle que la tolérance au NaCl, à la température et au pH et la production des enzymes hydrolytiques. Cette observation est valable aussi pour des espèces représentées par une minorité de souches. 32 isolats sur les 69 révélés producteurs d'enzymes hydrolytiques, ont montré des profils inacceptables et restent non identifiés par API. Les galeries API System, sont des tests miniaturisés décrits principalement pour l'identification rapide des bactéries médicales. Néanmoins, ces tests ont été largement utilisés depuis plus de 20 ans pour l'identification des bactéries environnementales (microbiologie aquatique et marine [21]). L'utilisation de ces galeries s'est avérée très rentable pour la plus part des bactéries assujetties à ces tests phénotypiques. Cependant, ces galeries possèdent certaines limites. En effet, [22] dans leur étude sur l'identification des espèces du genre *Bacillus* par les galeries API ont dressé la liste des espèces non différenciables ainsi que les espèces fastidieuses nécessitant des conditions de culture appropriées à considérer lors des tests API. De plus, sur les 600 souches testées dans leur étude 91 sont restées non identifiées. Ces dernières années l'étude de la diversité bactérienne a comporté une combinaison des caractérisations chimio-taxonomiques, phénotypiques et génotypiques, afin d'aboutir à une taxonomie bactérienne stable [23].

4-3. Caractérisation physiologique

L'étude physiologique des souches sur milieu Columbia Agar à différentes conditions physico-chimiques (salinité, pH, et température) montre que 11,9 % des souches poussent à un intervalle de 5 à 20 % de NaCl ce qui permet de les considérer comme des souches extrêmement halotolérantes selon Kushner [24]. Les résultats montrent aussi que 61,9 % des souches poussent à des concentrations de 5 à 15 % de NaCl, et qui peuvent être considérées comme des halophiles modérés selon [25]. Il est difficile d'établir des limites qui définissent l'halophilisme et l'halotolérance car de nombreux facteurs comme la température, la concentration et la présence et la nature de nutriments disponibles aussi la présence des autres sels modifient considérablement la réponse des microorganismes au NaCl [24, 26]. 88,09% des isolats ont poussé à pH 4,5

et peuvent être considérés comme halophiles acidophiles. Ces résultats sont en accord avec les résultats d'autres études, dont il a été montré que les microorganismes halophiles ou halotolérants peuvent se développer à des pH acides grâce à des mécanismes d'acidotolérance comme exemple l'accumulation de solutés compatibles et de protons H⁺ [27]. Les souches isolées ont montré aussi une tolérance à des pH basiques, ce qui corrèle avec les résultats obtenus par [28] qui a isolé des espèces halophiles du genre *Bacillus* à partir d'un lac salé au Japon et qui tolèrent des concentrations salines supérieures à 30 % et poussent à des pH de 6 à 8 avec un optimum de 7. L'évaluation de la croissance des souches à différentes températures montre que toutes les souches poussent à 30°C, il s'agit donc de souches mésophiles. 41,33 % des isolats ont également poussé à une température de 10°C et autant à 50°C et peuvent être considérés respectivement comme halophiles mésophiles psychrotolérants et thermotolérants [29].

4-4. Production d'enzymes extracellulaires

Peu d'études ont été menées sur la diversité microbienne et la production d'enzymes extracellulaires dans les habitats salins et hypersalins dans le monde. [6], ont montré l'abondance de cinq enzymes hydrolytiques comprenant l'amylase, protéase, lipase, DNase et pullulanase produites par des bactéries halophiles modérées isolées des salines en Espagne; [8] ont effectué un screening des bactéries halophiles productrices de neuf hydrolyses extracellulaires à partir du lac Howz-Soltan en Iran; [30] ont étudié la diversité de neuf enzymes hydrolytiques à partir de souches haloarchaïennes du lac Aran-Bidgol, en Iran et finalement [31] ont réalisé un screening de bactéries halophiles produisant trois enzymes d'importance industrielle. Pour le cas de notre étude, sur les 84 isolats étudiés, 71 sont producteurs d'enzymes hydrolytiques extracellulaires. Ils sont dotés, principalement, d'une activité cellulolytique (43 isolats), amylolytique (34 isolats) et protéolytique (23 isolats).

- *Cellulases*. Les cellulases halophiles et halotolérantes dérivent habituellement des *Bacillus* sp. [32] et de *Salinivibrio* sp. [45]. Pour le cas de notre étude, les souches à Gram + (43 isolats) se sont révélées plus productrices de cellulases que les Gram - (13 isolats) et parmi elles 18 se sont identifiées comme membres des genres *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Kocuria*. Ces enzymes ont été rapportées comme étant thermostables, halostables et alcalostables et candidats idéaux pour nombreuses applications industrielles. Les cellulases sont principalement utilisées dans l'industrie textile [33]. L'intérêt aux cellulases augmente également dans la production du bioéthanol comme les enzymes qui sont employées pour hydrolyser les matériaux cellulosiques prétraités pour les sucres fermentescibles [34];
- *Amylases*. Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent les molécules d'amidon en dextrines et progressivement en petits polymères composés d'unités de glucose [35]. Ces enzymes constituent une classe d'enzymes industrielles, qui à elle seule forme 25 % des enzymes du marché couvrant plusieurs processus industriels tels que les industries du sucre, de textile, de papier et produits pharmaceutiques [36]. Les amylases halophiles sont généralement des cyclomaltodextrinases produites par plusieurs espèces, nous en citons : *Micrococcus halobius* [37], *Holomonas meridiana* [38], *Halobacillus* sp. [39], *Halothermothrix orenii* [40], *Streptomyces* sp. [41] et par *Chromohalobacter* sp. [23]. Pour le cas de notre étude, les souches à Gram- (22 isolats) se sont révélées plus productrices d'amylases que les Gram + (12 isolats) et parmi elles 9 se sont identifiées comme membres des genres *Enterobacter*, *Moraxella* et *Stenophomonas*. Ces enzymes montrent généralement des optimums d'activité à pH élevés, une stabilité et elles demeurent actives à des températures au-dessus de 50°C [4].

- Protéases.** Les protéases microbiennes sont intensivement étudiées et largement appliquées dans des processus industriels. Elles sont généralement employées comme additifs de détergents, dans la transformation des produits alimentaires, dans l'industrie pharmaceutique, du cuir et dans la transformation des déchets [42]. Les protéases halophiles ont été isolées et caractérisées de plusieurs espèces bactériennes incluant : *Bacillus sp.* [43, 44], *Pseudoaltermonas sp.* [45], *Salinivibrio sp.* [46], *Salicola sp.* [7], *Halobacillus sp.* [42], *Filobacillus sp.* [47], *Chromohalobacter sp.* [48], *Nesterenkonia sp.* [49] et *Virgibacillus sp.* [50]. Pour le cas de notre étude, les souches à Gram + (23 isolats) se sont révélées plus productrices de protéases que les Gram - (17 isolats) et parmi elles 8 se sont identifiées comme membres des genres *Staphylococcus*, *Enterococcus* et *Bacillus*. Ces enzymes ont une activité optimale en présence de NaCl et maintiennent leur stabilité dans un intervalle de pH allant de 5 à 10. Aussi, il a été rapporté que ces enzymes sont actives à des températures de 40 et 75°C [9].
- DNases.** 19 souches principalement à Gram + (13 isolats), possèdent une activité DNase. Nos résultats concordent avec ceux trouvés par [6, 8, 51, 52] qui ont également décelé la production d'enzymes extracellulaires de type DNases à partir d'espèces bactériennes Gram + isolées d'environnements salins et hyper salins respectivement au sud de l'Espagne et en Iran. La révolution moléculaire ainsi que celle de la génomique de ces trente dernières années reposent sur l'utilisation d'outils moléculaires capables de couper, réparer, copier, ligaturer des fragments d'ADN *in vitro*. Pour la PCR, la clé du système réside dans l'utilisation d'ADN polymérases thermostables, capables de supporter les nombreux cycles de montée en température, indispensable pour dénaturer l'ADN double brin. Plusieurs domaines sont plus particulièrement demandeurs de nouvelles ADN polymérases : le bioterrorisme, avec l'objectif de disposer d'ADN polymérases fonctionnelles dans des conditions drastiques (présence de solvants et autres inhibiteurs), la médecine légale et les recherches sur les ADN anciens ou fossiles, caractérisés par une fréquence élevée de lésions dans les ADN génomiques récupérés [53].
- Lipases.** 17 souches sont dotées d'activité lipolytique. Les lipases ont trouvé de multiples applications dans les industries médicales et agroalimentaires, dans la production de détergent et de biodiesel, dans la synthèse d'arômes, etc. Elles constituent l'une des cibles majeures des travaux de recherche en biocatalyse et le nombre d'articles qui leur est consacré s'accroît très rapidement. Ces travaux ont montré que les réactions catalysées par les lipases sont plus sélectives et plus efficaces que beaucoup de réactions homologues en chimie organique. L'utilisation de lipases en biocatalyse asymétrique constitue une voie prometteuse pour obtenir des composés énantiomériquement purs ou enrichis [54]. Pour l'instant plusieurs études ont permis de révéler plusieurs activités lipolytiques dans le monde des halophiles. Les souches ont été identifiées comme membres des genres suivants : *Salicola*, *Halovibrio*, *Halomonas*, *Oceanobacillus*, *Thalassobacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Gracilibacillus*, *Salinicoccus*, *Piscibacillus* [8], *Salinivibrio sp.* [39] *Staphylococcus* [55] et *Bacillus* [56]. Ces microorganismes produisent des lipases actives en présence de fortes concentrations salines [8]. Pour le cas de notre étude, les souches à Gram + (10 isolats) se sont révélées plus productrices de lipases que les Gram - (7 isolats) et parmi elles 3 peuvent agir dans un large éventail de pH et de température, bien que les lipases bactériennes alcalines soient plus fréquentes [57].

Aucune différence significative dans les activités hydrolytiques n'a été observée en fonction de l'origine des échantillons (eau ou sédiment). Cependant, il est intéressant de noter que parmi les souches isolées, 60 possèdent des activités hydrolytiques combinées (4 activités combinées : 5 souches ; 3 activités combinées :

22 souches et 2 activités combinées : 33 souches), d'où leur importance biotechnologique. La présence de telle combinaison chez les halophiles a été rapportée par de nombreuses études réalisées sur des habitats hypersalins géographiquement séparés en Espagne, Iran, Tunisie, Inde, en Argentine et Pérou [6, 8, 10, 31, 51, 52, 58 - 60]. Il faut noter également que les souches à Gram positifs 44 (52,38 %) possèdent plus d'activités hydrolytiques envers les polymères testés que les souches Gram – 27 (32,14 %). Ces résultats sont en accords avec ceux de nombreux auteurs [4, 8, 45].

4-5. Potentiel biotechnologique des espèces halophiles identifiées

Dans cette étude nous avons prouvé que les différentes bactéries isolées des eaux et sédiments des marais salants de Tarfaya sont capables de sécréter au moins une des enzymes extracellulaires testées ; ce qui montre que *in situ* le « microbiota » a pu s'adapter génétiquement et physiologiquement pour utiliser la matière organique contenue dans ces compartiments marins grâce à la production d'enzymes. En effet, certaines souches sont même capables de produire quatre enzymes hydrolytiques extracellulaires sur les cinq testées. Les différentes enzymes détectées dans cette étude pourraient également être une source de nouveau biocatalyseur pour des applications biotechnologiques. Plusieurs travaux ont mis l'accent sur le potentiel biotechnologique des bactéries halophiles dites modérées ou halotolérantes, avec de nombreuses applications industrielles. Toutes les espèces que nous avons identifiées dans ce travail sont décrites comme étant à potentiel biotechnologique par la production d'enzymes, de bactériocines et de métabolites secondaires, par leur utilisation dans le cadre de la bio remédiation ou encore dans la lutte contre les maladies phyto sanitaires (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Potentiel biotechnologique des bactéries halophiles modérées isolées des salines de Tarfaya

| Espèce | Potentiel | Application biotechnologique | Références bibliographiques |
|---------------------------------------|--|---|-----------------------------|
| <i>Enterobacter chloacae</i> | Enzymes (Dioxygénases) | Biodégradation de pétrole | [61] |
| <i>Enterococcus spp</i> | Bactériocines | Probiotique | [62] |
| <i>Staphylococcus warneri</i> | Enzymes (lipases) | | [63] |
| <i>Staphylococcus sciuri</i> | Enzymes | Biofertilisants (antioxydants) | [64] |
| <i>Staphylococcus cohnii cohnii</i> | Bio polymère (Bio flocculant extra cellulaire) | Traitement par floculation des eaux résiduaires des industries agro-alimentaires et chimiques | [65] |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | Enzymes (Lipases) | Digestion anaérobique des eaux résiduaires des industries huilières | [66] |
| <i>Staphylococcus chromogenes</i> | Enzymes (Lipases) | Industrie huilière | [67] |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Enzymes (Histidine kinase) | Activité anti biofilm | [68] |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Enzymes | Biocatalyse chimique | [69] |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Lipases | Trans estérification des solvants organiques | [70] |
| <i>Pseudomonas luteola</i> | Enzymes Lipases | Biocatalyse chimique | [71] |
| <i>Kocuria spp</i> | Enzymes (Amylases) | Potentiel industriel élevé | [72] |
| <i>Stenophomonas maltophilia</i> | Enzymes (Lipases) | Potentiel dans la synthèse organique | [73] |
| <i>Pasteurella spp (P. multocida)</i> | Bio polymères (Exopolysaccharides) | Application médicale (Biosynthèse d'acide hyaluronique) | [74] |
| <i>Moraxella spp</i> | | Bioconversion de l'acide salicilique | [75] |
| <i>Bacillus megaterium</i> | Enzymes | Galactosylation de produits naturels | [76] |
| <i>Bacillus cereus</i> | | Bioremédiation (biosurfactant) | [77] |

5. Conclusion

Ce travail porte sur la caractérisation de la flore bactérienne dans un environnement salin du sud du Maroc. Il permet d'explorer et de valoriser la flore microbienne des sédiments et de l'eau des marais salants de Tazgha situés dans la région de Tarfaya. Ces compartiments montrent une grande diversité bactérienne. Les 84 isolats sur les 205 étudiés sont considérés comme étant des bactéries halophiles modérées et halotolérantes, pour la plus part des Gram positifs. Leur caractérisation a permis de mettre en évidence leur capacité à s'adapter à d'autres conditions extrême outre que le sel : 64,28 % thermophiles halophiles, 17,85 % psychrophiles halophiles, 88,09 % acidophiles halophiles et 33,33 % alcalophiles halophiles et à produire des enzymes hydrolytiques : 51,19 % produisent des cellulases, 40,46 % des amylases, 27,38 % des protéases, 22,61 % des DNases, 20,23 % des lipases et 71,42 % possédant des activités hydrolytiques combinées.

Références

- [1] - E. MELLADO and A. VENTOSA, Biotechnological potentiel of moderately and extremely halophilic microorganisms. In *"Microorganisms for Health Car, Food and Enzyme Production. Research Signpost"*, Ed. Barredo JL, Kerala, (2003) 233 - 256
- [2] - N. SADFI-ZOUAOU, B. ESSGHAIER, M. R. HAJLAOUI, M. L. FARDEAU, J. L. CAYAOL, B. OLLIVIER and A. BOUDABOUS, Ability of Moderately Halophilic Bacteria to Control Grey Mould Disease and Tomato Fruits. *J. Phytopathol.*, 156 (2008) 42 - 52
- [3] - L. GOVENDER, L. NAIDOO and M. E. SETATI, Isolation of hydrolase producing bacteria from Sua pan solar salterns and the production of endo-1, 4- β -xylanase from a newly isolated haloalkaliphilic *Nesterenkonia* sp. *Afr. J. Biotechnol.*, 8 (2009) 5458 - 5466
- [4] - M. L. MORENO, D. PÉREZ, M. T. GARCÍA and E. MELLADO, Halophilic Bacteria as a Source of Novel Hydrolytic Enzymes. *Life*, 3 (2013) 38 - 51
- [5] - C. SANCEZ-PORRO, Caracterización bioquímica y molecular de la haloproteasa CP1 producida por *Pseudoalteromonas rutenica*. *Tesis doctoral, 1 Junio, Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla*, (2005) 363 p.
- [6] - C. SÁNCHEZ-PORRO, S. MARTIN, E. MELLADO and A. VENTOSA, Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Appl. Microbiol.*, 94 (2003) 295 - 300
- [7] - M. L. MORENO, M. T. GARCIA, A. VENTOSA and E. MELLADO, Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase- and protease producing extreme halophile. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 68 (2009) 59 - 71
- [8] - R. ROHBAN R., M. A. AMOOZEGAR and A. VENTOSA, Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 6 (2009) 333 - 340
- [9] - M. E. SETATI. Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria. *Afr J Biotechnol.*, 9 (11) (2010) 1555 - 1560
- [10] - P. ZARPARVA, M. A. AMOOZEGAR, H. BABAVALIAN, M. R. FALLAHIAN, H. TEBYANIAN and F. SHAKERI, Isolation and identification of culturable halophilic bacteria with producing hydrolytic enzyme from Incheh Broun hypersaline wetland in Iran. *Cell. Mol. Biol.*, 2 (12) (2016) 31 - 36
- [11] - L. M. PRESCOTT, J. P. HARLEY and D. A. KLEIN. *"Microbiology"*, 5th Ed. McGraw-Hill, New York, (2003)
- [12] - B. HOLMES, W. R. WILLCOX and S. P. LAPAGE, Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E System. *J. Clin. Pathol.*, 31 (1998) 22 - 30
- [13] - R. R MARPELS and J. F. RICHARDSON, Evaluation of micromethod gallery API Staph for the identification of Staphylococci and Micrococci. *J. Clin. Pathol.*, 35 (1982) 650 - 656

- [14] - D. A. COWAN, *"Biotechnology, the Science and the Business"*, 2nd Ed. Harwood Academic Publishers, United Kingdom, UK, (1991) 311 - 340
- [15] - G. SIERRA, A Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 23 (1957) 15 - 22
- [16] - C. D. JEFFRIES, D. F. HOLTMAN and D. G. GUSE, A rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J. Bacteriol.*, 73 (1957) 591 - 613
- [17] - M. R. RICARD, The population of diatomic in the gons of the archipelago of the Polynésie. *Rev. Algol.*, XII, (3-4) (1977)
- [18] - H. JIANG, H. DONG, G. ZHANG, B. YU, L. R. CHAPMAN and M.W. FIELDS, Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athallassohaline lake in northwestern China. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (2006) 3832 - 3845
- [19] - A. M. SASS, B. A. MCKEEW, H. SASS, J. FICHEL, K. N. TIMMIS and T. J. MC GENITY, Diversity of Bacillus - like organism isolated from deep- sea hypersaline anoxic sediments. *Saline systems*, 4 (8) (2008) 1 - 11
- [20] - K. PEETERS, D. ERTZ and A. WELLEMS. Culturable bacterial diversity at the princess Elisabeth Station (Utsteinen, Sor Rondane Mouantains, East Antarctica) harbours many new taxa. *Syst. Appli. Microbiol.*, 34 (2011) 360 - 367
- [21] - H. HACÈNE, F. RAFA, N. CHEBBOUNI, S. BOUTAIBA, T. BHATNAGAR, J. C. BARRATI and B. OLLIVIER, Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea Salt Lake, Algerian Sahara. *J. Arid. Environ.*, 58 (2004) 273 - 284
- [22] - N. A. LOGAN and R.C.W. BERKELEY, Identification of Bacillus strains using API system. *J. Gem. Microbiol.*, 130 (1984) 1871 - 1882
- [23] - B. PRAKASH, M. VIDYASAGAR, M. S. MADHUKUMAR, G. MURALIKRISHNA and K. SREERAMULU, Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α -amylase from *Chromohalobacter sp.* TVSP 101. *Process Biochem.*, 44 (2009) 210 - 215
- [24] - D. J. KUSHNER, Growth and nutrition of halophilic bacteria. In *"The biology of halophilic bacteria"*, Eds. R. H. Vreeland & L. I. Hochstein, Boca Raton, Fla., (1993) 87 - 103
- [25] - D. J. KUSHNER, Life in high salt and solute concentrations. In *"Microbial Life in Extreme Environments"*, Ed. Academic Press, London, (1978) 317 - 368
- [26] - A. VENTOSA, J. J. NIETO and A. OREN, Biology of aerobic moderately halophilic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 (1998) 504 - 544
- [27] - O. LEWINSON, E. PADAN and E. BIBI, Alkalitolerance : A biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis. *P.N.A.S.*, 39 (2004) 14073 - 14078
- [28] - A. VENTOSA, M. T. GARCIA, M. KAMEKURA, H. ONISHI and F. RUIZ-BERRAQUERO, *Bacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic *Bacillus* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, (1990) 401 - 405
- [29] - S. D'AMICO, T. COLLINS, J.C MARX, G. FELLER and C. GERDAY, Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Reports*, 7 (2006) 385 - 389
- [30] - K. A. MAKHDOUMI, M. A. AMOOZEGAR and K. E. MAHMODI, Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaeal strains isolated from salt lake. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 8 (2011) 705 - 714
- [31] - S. KUMAR, R. KARAN, S. KAPOOR, S. P. SINGH, S. K. KHARE, Screening and Isolation of Halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Braz. J. Microbiol.*, 43 (2012) 1595 - 1603
- [32] - A. AYGAN and B. ARIKAN, A new halo-alkaliphilic, thermostable endoglucanase from moderately halophilic *Bacillus* sp. C14 isolated from Van soda lake. *Int. J. Agric. Biol.*, 10 (2008) 369 - 374
- [33] - A. H. KORANY, A. E. ALI, T. M. ESSAM and S. A. MEGAHED, Optimization of Cellulase production by *Halobacillus* sp. QLS 31 Isolated from Lake Qarun, Egypt. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, (2017) 1 - 11

- [34] - C. Y. WANG, Y. R. HSIEH, C. C. NG, H. CHAN, H. T. LIN, W. S. TZENG and Y. T. SHYU, Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05. *Enzyme Microb. Technol.*, 44 (2009) 373 - 379
- [35] - W. CHENA, J. CHANGB, C. CHUIA, S. CHANGC, W. CHENA and C. JIANGA, *Caldimonas taiwanensis* sp. nov., a amylase producing bacterium isolated from a hot spring. *Syst. Appl. Microbiol.*, 28 (2005) 415 - 420
- [36] - M. SHAFIEI, A. A. ZIAEE and M. A. AMOOZEGAR, Purification and characterization of a halophilic - amylase with increased activity in the presence of organic solvents from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. *Extremophiles.*, 16 (2012) 627 - 635
- [37] - H. ONISHI and K. SONODA, Purification and Some Properties of an Extracellular Amylase from a Moderate Halophile, *Micrococcus halobius*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38 (4) (1979) 616 - 620
- [38] - M. CORONADO, C. VARGAS, J. HOFEMEISTER, A. VENTOSA and J.J. NIETO, Production and biochemical characterization of an alpha-amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000 183 (1) (2000) 67 - 71
- [39] - M. A. AMOOZEGAR, P. SCHUMANN, M. HAJIGHASEMI, M. ASHENGROPH and M.R. RAZAVI. *Salinicoccus iranensis* sp. a novel moderate halophile. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58 (2008) 178 - 183
- [40] - B. N. MIJTS and B. K. PATEL, Cloning, sequencing and expression of an alpha-amylase gene, amyA, from the thermophilic halophile *Halothermothrix orenii* and purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiology*, 148 (8) (2002) 2343 - 2349
- [41] - S. CHAKRABORTY, A. KHOPADE, C. KOKARE, K. MAHADIK and B. CHOPADE, Isolation and characterization of novel α -amylase from marine *Streptomyces* sp. D1. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 58 (2009) 17 - 23
- [42] - H. R. KARBALAEI-HEIDARI, M. A. AMOOZEGAR and A. A. ZIAEE, Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium. *Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36 (2009) 21 - 27
- [43] - E. SETYORINI, S. TAKENAKA, S. MURAKAMI and K. AOKI, Purification and characterization of two novel halotolerant extracellular protease from *Bacillus subtilis* strain FP- 133. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (2006) 433 - 440
- [44] - P. SHIVANANDA and G. JAYARAMAND, Production of extracellular protease from halotolerant bacterium. *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochem.*, 44 (2009) 1088 - 1094
- [45] - C. SÁNCHEZ-PORRO, S. MELLADO, C. BERTOLDO, G. ANTRANIKIAN and A. VENTOSA. Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76. *Extremophiles.*, 7 (2003) 221 - 228
- [46] - M. A. AMOOZEGAR, Z. A. FATEMI, H. R. KARBALAEI-HEIDARI and M. R. RAZAVI, Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiol. Res.*, 162 (2007) 369 - 377
- [47] - H. HIRAGA, Y. NISHIKATA, S. NAMWONG, S. TANASUPAWAT, K. TAKADA. And K. ODA, Purification and characterization of serine proteinase from halophilic bacterium, *Filibacillus* sp. RF- 5. *Biosci*
- [48] - M. VIDYASAGAR, S. PRAKASH, V. MAHAJAN, Y. S. SHOUC and K. SREERAMULO. Purification and characterization of serine proteinase from halophilic bacterium, *Chromohalobacter Filibacillus* sp. TVSP101. *Braz. J. Microbiol.*, 40 (2009) 12 - 19
- [49] - S. BAKHTIAR, R. J. ESTIVEIRA and R. HATTI-KAUL, Substrate specificity of alkaline protease from alkaliphilic feather-degrading *Nesterenkonia* sp. AL20. *Enzyme Microb. Technol.*, 37 (2005) 534 - 540
- [50] - S. SINSUWAN, S. RODTONG and J. YONGSAWATDIGUL, Purification and characterization of a salt-activated and organic solvent-stable heterotrimer proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from Thai fish sauce. *J. Agri. Food Chem.*, 58 (2010) 248 - 256

- [51] - H. BABAVALIAN, M. A. AMOOZEGAR, A. A. POURBABAEE, M. M. MOGHADDAM and F. SHAKERI, Isolation and identification of moderately halophilic bacteria producing hydrolytic enzymes from the largest hypersaline playa in Iran. *Microbiology*, 82 (4) (2013) 466 - 474
- [52] - H. BABAVALIAN, M. A. AMOOZEGAR, S. ZAHRAEI, R. ROHBAN, F. SHAKERI and M. M. MOGHADDAM, Comparison of Bacterial Biodiversity and Enzyme Production in Three Hypersaline Lakes; Urmia, Howz-Soltan and Aran-Bidgol. *Indian J. Microbiol.*, 54 (4) (2014) 444 - 449
- [53] - J. QUERELLOU. Biotechnologie des archées. *BIOFUTUR*, 310 (2010) 45 - 48
- [54] - A. GHANEM, Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure enriched compounds. *Tetrahedron*, 63 (8) (2007) 1721 - 1754
- [55] - P. ESAKKIRAJ, M. RAJKUMARBHARATHI, A. PALAVESAM and G. IMMANUEL, Lipase production by *Staphylococcus epidermidis* CMST-Pi 1 isolated from the gut of shrimp *Penaeus indicus*. *Ann. Microbiol.*, 60 (2010) 37 - 42
- [56] - Y. GHASEMI, B. S. RASOUL-AMINI, B. A. KAZEMI, G. ZARRINIC, M. H. MOROWVAT and M. KARGAR, Isolation and characterization of some moderately halophilic bacteria with lipase activity. *Микробиология*, 80 (4) (2011) 477 - 481
- [57] - A. CASTILLA, P. PANIZZA, D. RODRÍGUEZ, L. BONINO, P. DÍAZ, G. IRAZOQUI and S. G. RODRÍGUEZ, A novel thermophilic and halophilic esterase from *Janibacter sp.* R02, the first member of a new lipase family (Family XVII). *Enzyme Microb Technol.*, 98 (2017) 86 - 95
- [58] - H. BAATI, R. AMDOUNI, N. GHARSALLAH, A. SGHIR and E. AMMAR, Isolation and characterization of moderately halophilic bacteria from Tunisian solar saltern. *Curr. Microbiol*, 60 (2010) 157 - 161
- [59] - J. BISWAS and A. K. PAUL, Production of extracellular enzymes by halophilic bacteria isolated from solar salterns. *Int. J. Appl. Biol. Pharma. Technol.*, 4 (4) (2013) 30 - 36
- [60] - D. NERCESSIAN, L. DI MEGLIO, R. DE CASTRO and R. PAGGI, Exploring the multiple biotechnological potential of halophilic microorganisms isolated from two Argentinean salterns. *Extremophiles.*, 19 (6) (2015) 1133 - 43
- [61] - A. C. KHORASANI, M. MASHREGHI and S. YAGHMAEI, Study on biodegradation of Mazut by newly isolated strain *Enterobacter cloacae* BBRC10061: improving and kinetic investigation. *Iranian Journal of Environmental Health Sciences & Engineering*, 10 (2) (2013) 1 - 7
- [62] - R. EL JENI, W. BELLILA, B. BOUHAOUALA-ZAHAR and M. EL BOUR, Activité antibactérienne d'*Enterococcus.sp* et *Leuconostoc.sp* sur les bactéries en pisciculture larvaire. *Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô*, 42 (2015) 65 - 67
- [63] - F. R. RECH, G. VOLPATO and M. A. AYUB, Optimization of lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17 using the polydimethylsiloxanes artificial oxygen carriers. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38 (9) (2011) 1599 - 604
- [64] - M. S. AKRAM, M. SHAHID, M. TARIQ, M. AZEEM, M. T. JAVED, S. SALEEM and S. RIAZ, Deciphering *Staphylococcus sciuri* SAT-17 Mediated Anti-oxidative Defense Mechanisms and Growth Modulations in Salt Stressed Maize (*Zea mays* L.). *Front Microbiol.*, 7 (867) (2016) 1 - 14
- [65] - Y. S. WONG, S. A. ONG, T. T. TENG, N. MINAH and K. KUMARAN, Production of Biofloculant by *Staphylococcus cohnii ssp.* from Palm Oil Mill Effluent (POME). *Water Air Soil Pollut.*, 223 (2012) 3775 - 3781
- [66] - S. CHERIF, F. ALOUI, F. CARRIERE and S. SAYADI, Lipase pré- hydrolysis enhance anaerobic biodigestion of soap stock from an oil refining industry. *J. Oleo Sci.*, 63 (2) (2016) 109 - 114
- [67] - M. GOLANI, H. KRISHNAN and G. P. PANDEY, Screening, Identification, Characterization and Production of Bacterial Lipase from Oil Spilled Soil. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 5 (3) (2016) 745 - 763
- [68] - Z. LV, D. ZHAO, J. CHANG, H. LIU, X. WANG, J. ZHENG, R. HUANG, Z. LIN, Y. SHANG, L. YEI, Y. WU, S. HAN and D. QU, Anti-bacterial and Anti-biofilm Evaluation of Thiazolopyrimidinone Derivatives

- Targeting the Histidine Kinase YycG Protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Frontiers in Microbiol.*, 8 (549) (2017) 1 - 10
- [69] - T. KIM, R. FLICK, J. BRUNZELLE, A. SINGER, E. EVDOKIMOVA, G. BROWN, J. C. JOO, G.A. MINASOV, W. F. ANDERSON, R. MAHADEVAN, A. SAVCHENKO and A. F. YAKUNIN, Novel Aldo-Keto Reductases for the Biocatalytic Conversion of 3-Hydroxybutanal to 1,3-Butanediol: Structural and Biochemical Studies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 83 (7) (2017) 1 - 34
- [70] - J. AGUSTIAN, A. H. KAMARUDDIN and H. Y. ABLOUL-ENEIN, Factors screening to statistical experimental design of racemic atenolol kinetic resolution via transesterification reaction in organic solvent using free *Pseudomonas fluorescens* lipase. *Chirality.*, 29 (7) (2017) 376 - 385
- [71] - L. KHANNOUS, M. JRAD, M. DAMMAK, R. MILADI, N. CHAABEN, B. KHEMAKHEM, N. GHARSALLAH and I. FENDRI, Isolation of a novel amylase and lipase-producing *Pseudomonas luteola* strain : study of amylase production conditions. *Lipids in Health and Disease.*, 13 (9) (2014) 1 - 9
- [72] - M. Y. SOTO-PADILLA, P. GORTARES-MOROYOQUI, L. A. CIRA-CHAVEZ, A. LEVASSEUR, L. DENDOOVEN and M. I. ESTRADA-ALVARADO, Characterization of extracellular amylase produced by haloalkalophilic strain *Kocuria* sp. HJ014. *Int. J. Health Res.*, 26 (4) (2016) 396 - 404
- [73] - M. LI, L. R. YANG, G. XU and J. P. WU, Cloning and characterization of a novel lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* GS11 : The first member of a new bacterial lipase family XVI. *J Biotechnol.*, 20 (2016) 30 - 36
- [74] - X. CHU, J. HAN, D. GUO, Z. FU, W. LIU, Y. TAO, Characterization of UDP-glucose dehydrogenase from *Pasteurella multocida* CVCC 408 and its application in hyaluronic acid biosynthesis. *Enzyme Microb Technol.*, 85 (2016) 64 - 70
- [75] - S. WAHIDULLAH, D. N. NAIK and P. DEVI, Fermentation Products of Solvent Tolerant Marine Bacterium *Moraxella* spp. MB1 and Its Biotechnological Applications in Salicylic Acid Bioconversion. *PLoS ONE*, 8 (12) (2013) 1 - 11
- [76] - Y. ZHOU, K. LIU, J. ZHANG, J. CHU and B. HE. Mg²⁺-induced stabilization of β -galactosidase from *Bacillus megaterium* and its application in the galactosylation of natural products. *Biotechnol Lett.*, 3 (2017) 1 - 7
- [77] - K. PATOWARY, R. PATOWARY, M.C. KALITA and S. DEKA, Development of an Efficient Bacterial Consortium for the Potential Remediation of Hydrocarbons from Contaminated Sites. *Frontiers in Microbiol.*, 7 (2016) 1 - 14