

Screening et isolement de bactéries halophiles productrices d'exo-enzymes hydrolytiques d'intérêt industriel à partir des marées salants du Centre Ouest du Maroc

Naïma BOUM'HANDI^{1*}, Mohamed El ALAOUI², Fayssal ELFILALI¹, Said HANOUNE¹,
Mouna MIRI³ et Abdessamad EL BARKAOU¹

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

² Université Chouaib Doukkali, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Laboratoire Valorisation des Ressources Naturelles et Biodiversité, BP 20 El Jadida, Maroc

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

* Correspondance, courriel : nboumhandi@yahoo.fr

Résumé

Le présent travail porte sur la caractérisation de la flore bactérienne dans un environnement salin du centre ouest du Maroc. Il permet d'explorer et de valoriser la flore microbienne des sédiments des marais salants de Sidi Moussa et de Sidi Abed situés dans la région de Oualidia- El Jadida. Ces compartiments montrent une grande diversité bactérienne. 94 isolats sur les 365 isolés ont été étudiés, les bactéries ont été considérées comme étant des bactéries halophiles modérées et halotolérantes, pour la plus part des Gram positif. 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 : 70,21% thermophiles halophiles, 27,65 % psychrophiles halophiles, 68,08 % acidophiles halophiles et 58,51 % alcalophiles halophiles et à produire des enzymes hydrolytiques : 50 % produisent des DNases, 41,48 % des cellulases, 26,59 % des amylases, 19,14 % des lipases, 11,70 % des protéases et 68 % possédant des activités hydrolytiques combinées.

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

Abstract

Screening and isolation of halophilic bacteria producing hydrolytic exo-enzymes of industrial interest from the salt marshes of western central Morocco

This work focuses on the characterization of bacterial flora in a saline environment in western central Morocco. It allows to explore and enhance the microbial flora of the sediments of the salt marshes of Sidi Moussa and Sidi Abed located in the region of Oualidia-El Jadida. These compartments show a great diversity of bacteria. 94 isolates out of the 365 isolates were studied; the bacteria were considered to be moderate and halotolerant halophile bacteria, mostly Gram positive. Isolated bacteria have shown enormous potential for biotechnology. Their characterization made it possible to demonstrate their ability to adapt to other extreme conditions

besides salt: 70.21 % thermophilic halophilic, 27.65 % psychophile halophilic, 68.08% acidophilic halophilic and 58.51 % halophilic alkalophiles and to produce hydrolytic enzymes : 50 % produce DNases, 41.48 % cellulases, 26.59 % amylases, 19.14 % lipases, 11.70 % proteases and 68 % possess combined hydrolytic activities.

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

1. Introduction

Les micro-organismes marins tels que les bactéries, virus et autres champignons offrent des possibilités encore souvent insoupçonnées en biomolécules originales et d'intérêt pour booster la bio-économie bleue [1]. Elles sont une source prometteuse de nouvelles molécules actives et de nouveaux procédés naturels pour les secteurs de l'alimentation, la cosmétique, la chimie de spécialité [2]. C'est dans ce contexte que le présent projet de recherche est proposé, motivé par un contexte applicatif en biotechnologie. En effet, 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 [3]. La biocatalyse industrielle a trouvé dans les microorganismes halophiles une source d'enzymes ayant de nouvelles propriétés [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 [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]. 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 [9]. 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. 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 timides. La thématique ainsi proposée étant nouvelle, il 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 du Maroc à savoir les salines de la région de Oualidia- El Jadida et comme objectif spécifique, l'isolement, la caractérisation et la recherche de potentiel biotechnologique des bactéries halophiles productrices d'enzymes hydrolytiques.

2. Matériel et méthodes

2-1. Échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé durant le mois d'avril 2016 au niveau de deux sites salins situés au niveau des marais salants d'Oualidia- Province d'El Jadida. Il s'agit des salines de Sidi Abed ($33^{\circ}02'N$, $08^{\circ}42'W$) et Ouelad Ghanem ($33^{\circ}01'N$, $08^{\circ}44'W$). Les prélèvements des échantillons de sédiments ont été effectués dans des flacons stériles à partir de deux points choisis par saline. Les échantillons correspondent aux trois premiers centimètres à la surface des sédiments. Les prélèvements sont ensuite transportés au laboratoire dans une glacière et conservés à $+4^{\circ}C$. 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 $30^{\circ}C$ 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 culturels et l'étude enzymatique de recherche de catalase et oxydase ont été déterminés par méthodes standards [10]. 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 (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) à utiliser :

- Galerie API 20E (REF 20 100) pour identification des bacilles à Gram négatif oxydase négative de type entérobactéries ;
- 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 ;
- 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 $30^{\circ}C$ 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. L'inoculation des galeries a été faite avec des cultures bactériennes post-exponentielles.

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 [11].

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 [12].

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) [13].

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 [14].

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 [11].

3. Résultats

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

La valeur moyenne de la concentration en sel varie de 168 à 348 g/L. Le pH moyen de 7,93 à 8,12 et la température moyenne de 19 à 22°C (*Tableau 1*). Ainsi, selon la classification des eaux salines, les marais salants de Oualidia de la région d'El Jadida pourraient être considérés comme biotope 3 car elles sont caractérisées par des concentrations en sel dépassant les 100 g/L [15]. Le pH légèrement alcalin des

sédiments (pH 7,93 à 8,12) 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

	Saline Sidi Abed		Saline Ouelad Ghanem	
	Point 1	Point 2	Point 1	Point 2
pH	7,99	8,04	7,93	8,12
Température (°C)	19	19	21	22
Salinité (g/l)	228	312	348	168
UFC/g	1,1 10 ⁸	5 10 ⁶	nd	5 10 ⁶

3-2. Isolement bactérien

Les bactéries halophiles sont présentes dans tous les échantillons 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 510⁶ à 1,1 10⁸ UFC/g mL (**Tableau 1**). Le criblage des microorganismes halophiles à partir des échantillons de sédiments des deux sites étudiés a permis l'isolement de 365 isolats. Pour la suite de notre étude, 94 isolats ont été sélectionnés en se basant sur les différences macroscopiques et microscopiques des souches soit : 69 souches isolés à partir des salines de Ouelad Ghanem et 25 à partir des salines de sidi Abed.

3-3. Caractérisation phénotypique

3-3-1. Caractères cultureux et analyses microscopiques

Sur milieu Columbia à différentes concentrations en sel ont été obtenus, 19 isolats (38,7 %) de couleur crème, 17 isolats (34,6 %) jaunes verdâtres, 12 isolats (24,5 %) jaunes oranges et 1 isolat (2 %) présentant une coloration carrément rose. Sur milieu TSA à différentes concentration en sel ont été obtenus, 18 isolats (40,9 %) présentant une coloration crème, 16 isolats (16,7 %) une coloration jaune verdâtre et 11 isolats (25 %) une coloration jaune et orange. Sur les 94 isolats étudiés, 65 (67,70 %) sont à Gram positif alors que 31 (32,29 %) sont à Gram négatif. La plupart des isolats (83 %) sont catalase positive et oxydase négative. Tous les isolats se sont développés en conditions d'aérobies sur milieux Columbia et TSA à 5 % de NaCl pendant 24 à 48h à une température d'incubation de 30°C et à pH 7,5.

3-3-2. 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 7 genres différents pour la plupart d'origine environnementale : *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Chryseobacterium*, *Photobacterium* et *Eikinella*. Les bactéries Gram positif sont représentées exclusivement par le genre *Staphylococcus*, reportés comme suit : *Staphylococcus aureus* (4 isolats), *Staphylococcus warneri*(3 isolats), *Staphylococcus cohnii cohnii*(5 isolats), *Staphylococcus sciurii*(7 isolats) et *Staphylococcus epidermidis*(9 isolat). Pour les bactéries à Gram négatif dominées par les genres *Pasteurella* (41,37 %), *Chryseobacterium* (24,13 %) et *Pseudomonas* (17,24 %), elles ont été assignées respectivement à *Pasteurella pneumonia* (12 isolats), *Chryseobacterium meningoseptium* (7 isolats), *Pseudomonas luteola* (5 isolats), *Photobacterium damsela*(2 isolats), *Pseudomonas fluorescens* (1 isolat), *Vibrio fluvialis* (1isolat)

et *Eikinella corrodens* (1 isolat) (**Tableau 2**). Ces résultats permettent de conclure qu'en se basant sur le système galeries API, nous avons identifié biochimiquement plus que la moitié (65,51 %) des bactéries halophiles productrices d'enzymes extracellulaires isolées des marais salants d'Oualidia. 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 d'Oualidia 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

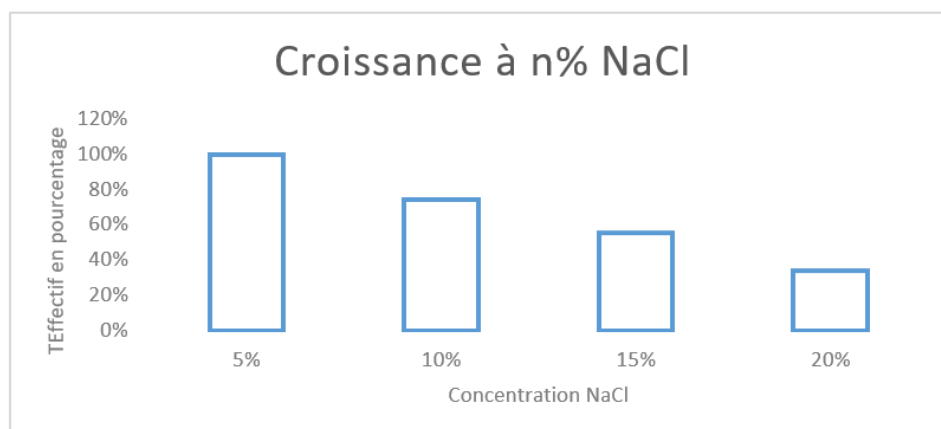
Tous les isolats poussent à des concentrations de NaCl de 5 %. Sur les 94 isolats, 70 (74,46 %) tolèrent des concentrations de 10 % de NaCl, 52 (55,31 %) une concentration de 15 % et 32 (34 %) une concentration de 20 % de NaCl. Parmi ces derniers 10 ont été identifiés comme *Chryseobacterium meningoseptium* (3), *Staphylococcus sciuri*(2), *S. aureus* (1), *S. warneri*(1), *S. epidermidis*(1), *Pasteurella pneumonia* (1) et *Vibrio fluvialis*(1) (**Figure 1 et Tableau 2**).

3-4-2. Température

Tous les isolats ont une température optimale de 30°C. Sur les 94 isolats, 66 (70,21 %) sont capables de croître à une température de 50°C. Cependant, seulement 26 (27,65 %) tolèrent une température de 10°C parmi eux 19 ont été identifiés comme étant des *Pasteurella pneumonia* (5), *Pseudomonas luteola* (3), *Staphylococcus sciuri*(3), *S. epidermidis*(2), *S. warneri*(2), *Chryseobacterium meningoseptium* (2), *S. aureus*(1) et *S. cohnii cohnii*(1) (**Figure 1 et Tableau 2**).

3-4-3. Ph

Tous les isolats étudiés tolèrent un pH de 7,5. Sur les 94 isolats, 64 (68,08 %) sont capables de pousser à pH de 4,5. Cependant, 56 (58,51 %) des isolats représentés par *Pasteurella pneumonia* (10), *S. epidermidis* (8), *Chryseobacterium meningoseptium* (7), *S. sciuri*(6), *S. cohnii cohnii*(5), *P. luteola* (5), *S. aureus* (4), *S. warneri*(3), *Photobacterium damsela*(2), *P. fluorescens*(1) et *V. fluvialis*(1) tolèrent un pH de 9,2 (**Figure 1 et Tableau 2**).



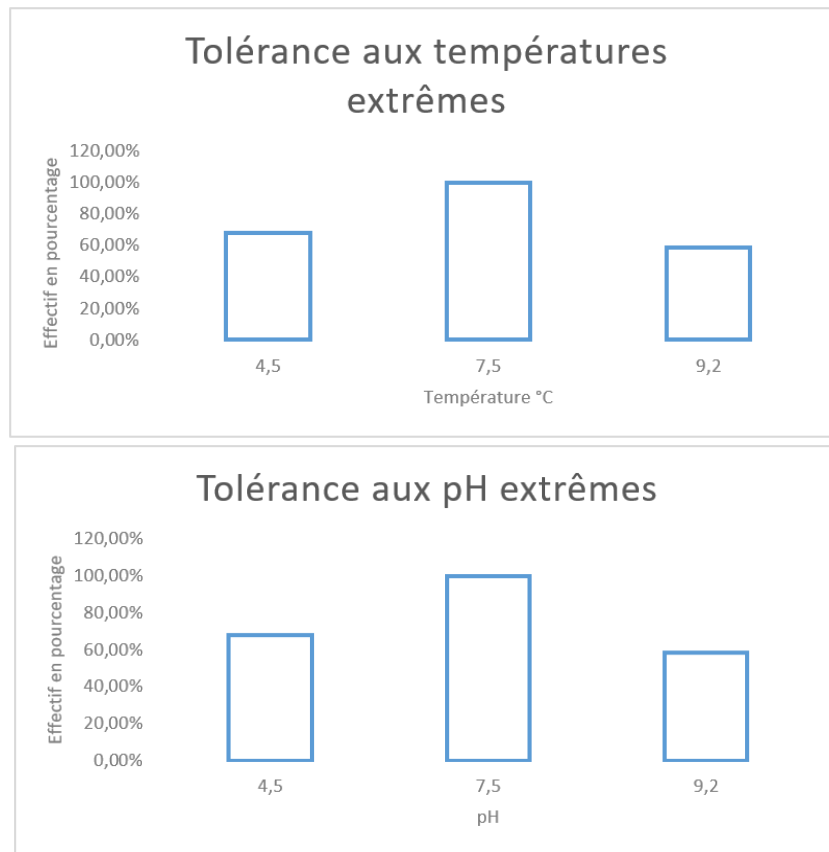


Figure 1 : Tolérance aux différentes concentrations en NaCl, températures et pH extrêmes des bactéries halophiles des salines de Oualidia

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 aureus</i> (4)	C7	++	++	++	+	++	++	++	-	+	+
	C9	++	++	w	-	+	++	++	w	+	+
	C16	++	++	w	-	++	++	++	-	+	+
	C46	++	w	w	w	+	++	++	+	+	+
<i>Staphylococcus warneri</i> (3)	C1	++	++	++	-	++	++	++	+	+	w
	C44	++	++	++	+	++	++	+	-	+	+
	C175	++	++	++	w	++	++	++	++	+	w
<i>Staphylococcus cohnii cohnii</i> (5)	C19	++	+	w	-	+	++	++	w	+	+
	C61	++	++	+	w	+	++	++	w	+	+
	C136	++	++	++	w	w	++	++	w	+	+

										+	+
	C140	++	++	++	w	+	++	+	w	+	-
	C141	++	+	w	w	w	++	+	+	+	w
<i>Staphylococcus sciuri</i> (7)	C27	++	+	-	-	+	++	+	+	+	-
	C90	++	++	++	+	+	++	++	+	+	+
	C111	++	++	+	w	++	++	++	-	+	+
	C37	++	++	+	+	-	++	+	++	+	+
	C47	++	++	w	w	++	++	+	w	+	+
	C114	++	++	w	w	+	++	++	w	+	w
	C53	-	++	-	-	w	++	w	w	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (9)	C35	++	++	++	+	+	++	++	+	+	+
	C72	++	++	++	w	+	++	+	w	+	-
	C135	++	++	++	w	w	++	++	w	+	+
	C34	++	++	++	w	++	++	++	w	+	+
	C83	++	++	w	-	++	++	++	w	+	+
	C123	++	++	++	-	+	++	w	-	+	+
	C127	++	++	w	w	+	++	++	w	+	w
	C128	++	++	w	w	+	++	++	+	+	w
	C137	++	++	++	w	+	++	++	w	+	+
<i>Pasteurella pneumonia</i> (12)	C17	++	+	+	-	w	++	-	w	+	w
	C43	++	w	-	-	+	++	+	+	+	-
	C70	++	w	w	w	++	++	++	+	+	+
	C92	++	+	w	-	+	++	++	w	+	+
	C93	++	++	++	+	+	++	++	w	+	+
	C96	++	++	w	-	+	++	++	w	+	w
	C98	++	++	+	w	++	++	++	+	+	w
	C101	++	+	+	w	+	++	w	+	+	w

	C118	+	-	-	-	++	++	++	++	+	w
	C151	++	++	++	w	w	++	++	-	+	+
	C172	++	++	w	w	+	++	w	w	+	+
	C174	++	++	++	w	w	++	++	w	+	+
<i>Pseudomonas luteola</i> (5)	C18	++	++	w	w	+	++	+	-	+	+
	C21	++	++	w	-	++	++	++	++	+	+
	C45	++	++	w	-	++	++	++	++	+	+
	C49	++	++	w	-	++	++	++	++	+	+
	C94	++	++	w	-	++	++	++	-	+	w
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	C160	++	++	w	w	+	++	+	-	+	-
<i>Chryseobacterium meningoseptium</i> (7)	C36	+	w	w	-	+	++	+	w	+	+
	C66	++	++	++	+	w	++	++	+	+	+
	C68	++	++	++	-	++	++	++	+	+	+
	C134	++	++	++	+	+	++	++	w	+	+
	C89	+	w	w	-	+	++	++	w	+	w
	C146	++	++	++	+	+	++	++	w	+	w
	C149	++	++	++	w	w	++	++	w	+	+
<i>Vibrio flufialis</i> (1)	C58	++	++	++	+	+	++	++	w	+	w
<i>Photobacterium damsela</i> (2)	C105	++	++	w	w	+	++	+	-	+	w
	C122	++	++	w	w	+	++	+	-	+	w
<i>Eikinella corrodens</i> (1)	C156	++	+	+	w	+	++	w	w	+	w

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

3-5. Production d'enzymes extracellulaires

Chacun des 94 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 94 isolats obtenus, 86 (91,48 %) ont montré au moins une activité hydrolytique. 47 (50 %) produisent de DNases, 39 (41,48 %) de Cellulases, 25 (26,59 %) d'Amylases, 18 (19,14 %) de Lipases et 11 (11,70 %) de protéases (**Figure 2**). Sur les 57 souches identifiées, 7 ont montré quatre activités hydrolytiques combinées

et ont été identifiées respectivement comme *Staphylococcus aureus* (3), *S. epidermidis* (1), *Pasteurella pneumonia* (1), *Vibrio fluvialis* (1) et *Photobacterium damsela* (1). 20 souches ont montré trois activités combinées et ont été identifiées comme étant : *Staphylococcus sciuri*(4), *S. epidermidis*(5), *S. cohnii cohnii*(1), *Pasteurella pneumonia* (4), *Pseudomonas luteola* (2), *Chryseobacterium meningoseptium* (3) et *Photobacterium damsela* (1). 12 sont capables de produire deux enzymes extracellulaires et ont été identifiées comme étant : *Staphylococcus cohnii cohnii*(2), *S. epidermidis*(2), *S. sciuri*(1), *Pasteurella pneumonia* (3), *Pseudomonas luteola*(1), *P. fluorescens*(1) et *Chryseobacterium meningoseptium*(2) (**Tableau 3**).

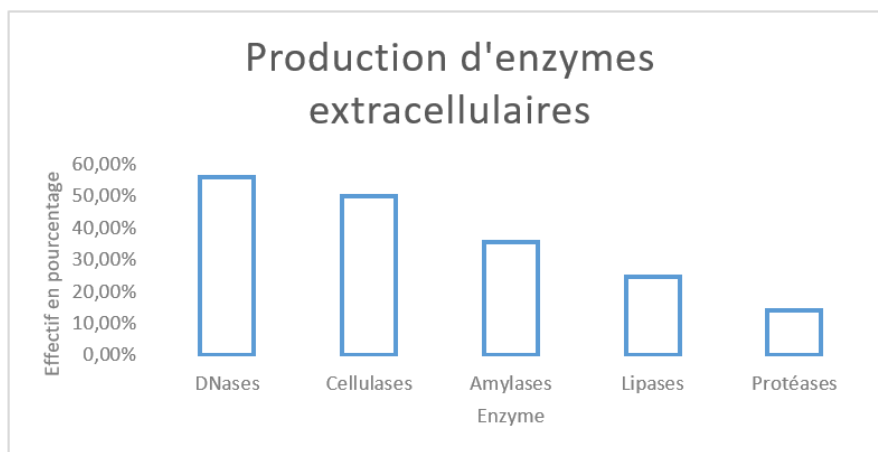


Figure 2 : Production d'enzymes extracellulaires chez les bactéries halophiles des salines d'Oualidia

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

Espèce (Nombre de souches)	Nombre de souches	Activité hydrolytique				
		Cellulases	DNases	Lipases	Protéases	Amylases
Gram- positif (28)						
<i>Staphylococcus aureus</i> (4)	1	++	-	-	-	-
	2	+++	++	+++	-	+++
	1	+	+++	+++	-	+++
<i>Staphylococcus warneri</i> (3)	2	++	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus cohnii cohnii</i> (5)	1	+	+++	-	-	-
	1	-	-	-	-	++
	1	+++	+++	-	+++	-
	1	++	+++	-	-	-
	1	-	+++	-	-	-
<i>Staphylococcus sciuri</i> (7)	1	-	+++	+	-	+++
	1	-	+	-	-	-
	1	++	-	-	-	-
	1	++	-	+++	++	-
	2	+	+++	-	-	++
	1	-	+++	-	-	+++
	1	-	+++	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (9)	1	-	+++	+++	-	+++
	1	+	-	-	-	+
	2	++	+++	-	+++	-
	1	++	-	-	+++	-
	1	++	+++	-	-	++

	1	+	+	-	+++	-
	1	+	+++	++	-	+++
Gram- négatif (29)						
	1	-	-	-	+++	-
	2	-	+++	-	-	-
	2	-	+++	-	++	-
	1	-	-	-	+++	-
<i>Pasteurella pneumonia</i> (12)	1	+	+++	+++	-	+++
	1	++	+++	++	-	-
	1	++	+++	-	-	+++
	2	++	-	++	-	+++
	1	+	+	-	-	-
	1	+	+++	-	-	+++
<i>Pseudomonas luteola</i> (5)	1	+	+++	-	-	-
	2	-	+++	-	-	-
	1	-	+++	+++	-	+++
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	1	-	-	+++	-	++
	2	++	++	-	-	-
<i>Chryseobacterium meningoseptum</i> (7)	3	++	+++	+++	-	-
	2	-	+++	-	-	-
<i>Vibrio fluvialis</i> (1)	1	++	++	++	-	++
	1	++	+++	+++	-	+++
<i>Photobacterium damsela</i> (2)	1	+	+++	-	-	+++
<i>Eikinella corrodens</i> (1)	1	++	-	-	-	-

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

4. Discussion

4-1. Diversité microbienne

Le comptage fait sur milieu Columbia additionné de sel montre que la charge bactérienne des échantillons de sédiments analysés varie de 10^6 à 10^8 UFC/g. Ces résultats concordent avec ceux rapportés dans des études antérieures faites au niveau d'écosystèmes hypersalins [16 - 19]. Dans le cas de notre étude, 7 genres et 12 espèces ont pu être répertoriés. Certaines espèces sont représentées par un seul isolat ce qui témoigne d'une grande diversité des bactéries isolées des sédiments des marais salants d'Oualidia. L'utilisation des galeries API comme outil d'identification des bactéries halophiles, nous a permis l'identification au niveau de l'espèce de 66,27 % isolats sur les 86 révélés producteurs d'enzymes hydrolytiques. En se basant sur les résultats obtenus, nous pouvons distinguer les quatre espèces dominantes identifiées comme étant *Pasteurella pneumonia* (12), *Staphylococcus epidermidis* (9), *Staphylococcus sciuri* (7), *Chryseobacterium meningoseptum* (7), *Staphylococcus cohnii cohnii* (5), *Pseudomonas luteola* (5), *Staphylococcus aureus* (4) et *Staphylococcus warneri* (3). La comparaison de nos résultats avec ceux obtenus au niveau des milieux hypersalins au nord [18] et au sud du Maroc [20] a révélé l'identification de nouvelles espèces bactériennes toutes productrices d'enzymes hydrolytiques dominée par : *Chryseobacterium meningoseptum* (7), *Photobacterium damsela* (2) et *Eikinella corrodens* (1) (**Tableau 3**). 29 isolats sur les 86 révélés producteurs d'enzymes hydrolytiques, ont montré des profils inacceptables et restent non identifiés par système API. L'utilisation des galeries API est avérée très rentable pour la plus part des bactéries médicales et environnementales [21]. Cependant, l'utilisation de ces galeries a montré certaines limites. Ces dernières années l'étude de la diversité bactérienne a porté sur la combinaison des caractérisations chimio-taxonomiques, phénotypiques et génotypiques ce qui

abouti à une taxonomie bactérienne stable [22]. Ainsi, l'identification des bactéries halophiles par une approche polyphasique alliant les techniques classiques et moléculaires a permis l'étude systématique appropriée de grands groupes bactériens, l'évaluation de la résolution taxonomique de différentes techniques [23] et l'établissement de bases de données comparables entre différents laboratoires de microbiologie appliquée [24].

4-2. Caractérisation physiologique

L'évaluation de la croissance des souches sur milieu Columbia Agar à différentes concentrations en NaCl montre que 34 % 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 [25]. Les résultats montrent aussi que 74,46 % des souches poussent à des concentrations de 5 à 15 % de NaCl, et qui peuvent être considérées comme des halophiles modérés selon Kushner [26]. 68,08 % des isolats ont poussé à pH 4,5 et peuvent être considérés comme halophiles acidophiles. 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 dans le cas de notre étude ont également montré une tolérance à des pH basiques, ce qui corrèle avec les résultats obtenus sur les bactéries halophiles isolées des marais salants au nord [20] et sud [18] du Maroc. Toutes les souches ont poussé à la température de 30°C. 70,21 % des isolats tolèrent des variations de températures de 30 à 50°C et 27,65 % ont une légère pousse à 10 °C. La température optimale de croissance des souches étudiées se situe dans la gamme 30-50°C. Il s'agit donc de souches mésophiles à thermotolérantes [28] (*Figure 1*).

4-3. Production d'enzymes extracellulaires

La capacité à produire cinq enzymes hydrolytiques différentes a été testée qualitativement sur les 94 isolats étudiés. Au total, 47, 39, 25, 18, et 11 souches ont pu produire respectivement des DNases, cellulases, amylases, lipases et des protéases. Des activités hydrolytiques combinées ont également été détectées chez 39 souches (*Tableau 3*). En effet, sur les 57 souches identifiées, 7 ont montré quatre activités hydrolytiques combinées. 20 souches ont montré trois activités combinées et 2 sont capables de produire deux enzymes extracellulaires (*Tableau 3*). Le nombre d'activités hydrolytiques était relativement plus élevé pour les isolats Gram négatifs modérément halophiles que pour les Gram positifs (*Tableau 3*). Des résultats similaires ont été obtenus par [29] qui ont montré que les enzymes hydrolytiques comprenant les amylases, protéases, lipases, DNases et la pullulanases étaient les enzymes les plus abondantes produites par les bactéries modérément halophiles isolées à partir de marais salants en Espagne. [30] ont montré que les amylases, lipases et protéases étaient des enzymes hydrolytiques importantes produites par des bactéries halophiles isolées à partir de salines de Pilluana, au Pérou. [31] ont étudié la diversité des halophytes extrêmes producteurs de lipases, protéases, amylases et nucléases dans des écosystèmes hypersalins du sud de l'Espagne. [32] ont montré que six enzymes (amylases, gélatinases, protéases, lipases, cellulases et xylanases) étaient les enzymes hydrolytiques les plus abondantes produites par des isolats bactériens à partir d'un cristal de sel souterrain situé dans la région de Slani Prahova. [33] ont étudié l'isolement de bactéries productrices d'hydrolase (xylanases, cellulases, mannanases) provenant de salines au Botswana. [34] ont examiné les bactéries halophiles du lac Howz Sultan (Iran) qui ont produit 9 hydrolases extracellulaires. Les souches produisant des DNases isolées étaient plus fréquentes que les producteurs d'autres enzymes étudiées et étaient les plus courantes comparées aux autres enzymes hydrolytiques étudiées. Presque tout les groupes d'isolats bactériens étaient capables de produire de la DNase et appartiennent tous au genre *Staphylococcus*. Contrairement aux études menées par [18] au niveau des salines de Tarfaya au sud atlantique du Maroc, les souches produisant des DNases étaient moins fréquentes. De

même, l'étude menée par [29] a montré que la production de DNase n'a pas été observée chez les cocci Gram positif et que les 28 souches productrices de DNase appartenaient plutôt aux genres *Bacillus* et *Halobacillus*. Il est à noter dans ce contexte que 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 [35]. Les souches à Gram positif (20 isolats) se sont révélées plus productrices de cellulases que les Gram négatif (17 isolats). Les cellulases halophiles et halotolérantes dérivent habituellement des *Bacillus sp.* [36] et de *Salinivibrio sp.* [37]. Pour le cas de notre étude, la plupart des souches produisant des cellulases appartiennent au genre *Staphylococcus*. Une telle découverte est similaire aux résultats de [18].

Selon la littérature, les cellulases 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 [38]. L'intérêt aux cellulases a également augmenté dans la production du bioéthanol et dans les réactions d'hydrolyse des matériaux cellulosiques prétraités pour les sucres fermentescibles [39]. Pour l'instant plusieurs études ont permis de révéler plusieurs activités lipolytiques dans le monde des halophiles. Ces microorganismes produisent des lipases actives en présence de fortes concentrations salines [34]. 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 [40]. 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* [34], *Salinivibrio sp.* [41] *Staphylococcus* [42] et *Bacillus* [43].

Ces microorganismes produisent des lipases actives en présence de fortes concentrations salines [34]. Pour le cas de notre étude, les souches à Gram négatif (11 isolats) se sont révélées plus productrices de lipases que les Gram positifs (7 isolats). Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par [31, 37]. Les souches les plus productrices de lipases appartenaient au genre *Staphylococcus*. Une telle découverte est similaires aux résultats de Boumhandi et al., [18]. Cependant, dans d'autres études, les souches productrices de lipases ont été identifiées comme membre des genres : *Salicola*, *Halovibrio*, *Halomonas*, *Oceanobacillus*, *Thalassobacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Gracilibacillus*, *Salinicoccus*, *Piscibacillus* [34], *Salinivibrio sp.* [41] et *Bacillus* [43]. 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 [44]. Les protéases halophiles ont été isolées et caractérisées de plusieurs espèces bactériennes incluant : *Bacillus sp.* [45], *Pseudaltermonas sp.* [37], *Salicola sp.* [46], *Halobacillus sp.* [44], *Filobacillus sp.* [47], *Nesterenkonia sp.* [48] et *Virgibacillus sp.* [49]. Pour le cas de notre étude, les souches à Gram positif (6 isolats) se sont révélées plus productrices de protéases que les Gram négatif (4 isolats). De tels résultats sont similaires à ceux menés par [18]. Les amylases 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 [50]. Les amylases halophiles sont généralement des cyclomaltodextrinases produites par plusieurs espèces, nous en citons : *Micrococcus halobius* [51], *Holomonas meridiana* [52], *Halobacillus sp.* [53], *Halothermothrix orenii* [54], *Streptomyces sp.* [55] et par *Chromohalobacter sp.* [56]. Pour le cas de notre étude, les souches à Gram positif (13 isolats) se sont révélées plus productrices d'amylases que les Gram négatif (10 isolats) et sont identifiées comme membre du genre *Staphylococcus*. 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 [57]. Il est intéressant de noter que parmi les souches isolées dans notre étude, 39 possèdent des activités hydrolytiques combinées. La présence de telle combinaison chez les halophiles a été rapportée par de nombreuses études similaires réalisées au niveau des habitats hypersalins géographiquement séparés en Espagne, Iran, Tunisie, Inde, en Argentine et Pérou [37, 46, 58]. Il est à noter également, l'introduction de nouveaux genres bactériens producteurs d'enzymes hydrolytiques isolés pour la première fois des milieux hypersalins. Il s'agit de *Chryseobacterium* révélé fort producteur de cellulases, de DNases et de lipases et *Eikenella* producteur de cellulases. Une nouvelle espèce de *Chryseobacterium* IHBB 10212 a été isolée récemment à partir des glaciers trans-Himalaya Indien dotée d'un fort potentiel de production de 6 enzymes hydrolytiques d'intérêt biotechnologique [59]. De même, à partir d'*Eikenella*, il a été isolé une nouvelle bactériocine désignée corrodécine aux propriétés intéressantes pour applications biotechnologiques dans le domaine de traitement des maladies parodontales [60]. Par ailleurs, il est important de noter que le marché global des enzymes industrielles et de spécialité est en constante croissance. Évalué à 4,2 milliards de dollars en 2014, il a atteint plus de 7 milliards de dollars en 2018 [61]. La tendance actuelle est au développement d'enzymes de spécialités, dont les marchés cumulés devraient à terme dépasser celui des enzymes industrielles. En outre, la montée en puissance des « technologies blanches » destinées dans l'industrie chimique à remplacer des process à fort impact sur l'environnement devrait renforcer l'intérêt des enzymes issues des extrêmophiles.

4-4. Potentiel biotechnologique des espèces halophiles identifiées

Plusieurs travaux ont mis l'accent sur le potentiel biotechnologique des bactéries halophiles dites modérées ou halotolérantes, avec de nombreuses applications industrielles [62]. Dans la présente étude, toutes les espèces identifiées 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 Oualidia

Espèce	Potentiel	Application biotechnologique	Références bibliographiques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Enzymes	Détection des ions cadmium	[63]
<i>Staphylococcus warneri</i>	Enzymes (lipases)		[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 sciuri</i>	Enzymes	Biofertilisants (antioxydants)	[66]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Enzymes (Histidine kinase)	Activité anti biofilm	[67]
<i>Pasteurella spp (P. multocida)</i>	Bio polymères (Exopolysaccharides)	Application médicale (Biosynthèse d'acide hyaluronique)	[68]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipases	Trans estérification des solvants organiques	[69]
<i>Pseudomonas luteola</i>	Enzymes Lipases	Biocatalyse chimique	[70]
<i>Chryseobacterium meningoseptum</i>	Enzymes Kyratonolytiques proteases	Biodegradation des bacteries du sol	[71]
<i>Vibrio fluvialis</i>	Enzymes (Protéases alcalines)	Détergent	[72]
<i>Photobacterium damsela</i>	Enzymes (trans- sialidase)	Synthèse des sialosides	[73]
<i>Eikinella corrodens</i>	Bacteriocin (Corrodecin)	Antagonisme	[74]

5. Conclusion

Le présent travail constitue la première caractérisation de la flore bactérienne dans un environnement salin situé au centre atlantique du Maroc. Il nous a permis d'explorer et de valoriser la flore microbienne des sédiments des marais salants de Sidi Moussa et de Sidi Abed situés dans la région de Oualidia- El Jadida. Ces compartiments ont montré une grande diversité bactérienne. 94 isolats sur les 365 isolés ont été étudiés, les bactéries ont été considérées comme étant des bactéries halophiles modérées et halotolérantes, pour la plus part des Gram positif. 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 : 70,21 % thermophiles halophiles, 27,65 % psychrophiles halophiles, 68,08 % acidophiles halophiles et 58,51 % alcalophiles halophiles et à produire des enzymes hydrolytiques : 50 % produisent des DNases, 41,48 % des cellulases, 26,59 % des amylases, 19,14 % des lipases, 11,70 % des protéases et 68 % possédant des activités hydrolytiques combinées.

Références

- [1] - J. L. STAL and M.S. CRETOIU, The marine microbiome : An untapped source of biodiversity and biotechnological applications. Ed. Springer, Switzerland, (20016) 480 p.
- [2] - C. BOYEN and P. JAUEN, Les Biotechnologies Marines dans le Grand Ouest. Travaux d'un groupe de réflexion au sein de l'Europole Mer sur le thème des *biotechnologies marines*, (2015) 61 p.
- [3] - N. SADFI-ZOUAOUI, 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
- [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] - M. E. SETATI, Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria, *Afr. J. Biotechnol.*, 9 (11) (2010) 1555 - 1560
- [9] - 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
- [10] - 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
- [11] - N. SADFI-ZOUAOUI, 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
- [12] - D. A. COWAN, *Biotechnology, the Science and the Business*, 2nd Ed. Harwood Academic Publishers, United Kingdom, UK, (1991) 311 - 340
- [13] - 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
- [14] - 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
- [15] - M. R. RICARD, The population of diatomic in the gons of the archipelago of the Polynésie, *Rev. Algol.*, XII, (3 - 4) (1977)
- [16] - 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 athalassohaline lake in northwestern China, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (2006) 3832 - 3845
- [17] - 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
- [18] - N. BOUMHANDI, F. ELFILALI, B. BOUALOUCH, S. HANOUNE, M. MIRI and A. EL BARKAOUI, Biodiversité modérées productrices d'enzymes hydrolytiques extracellulaires, *Afrique Science* 14(2) (2018) 353 - 3
- [19] - D. F. DAMMAK, Z. ZARAI, S. NAJAH, R. ABDENNABI, L. BELBAHRI, M. E. RATEB, H. MEJDOUB AND S. MAALEJ, Antagonistic Properties of Some Halophilic Thermoactinomycetes Isolated from Superficial Sediment of a Solar Saltern and Production of Cyclic Antimicrobial Peptides by the Novel Isolate

- Paludifilum halophilum*, *BioMed Res. Int.*, (2017) 1 - 13
- [20] - I. BERRADA, A. WILLEMS, P. DE VOS, M. EL FAHIME, J. SWINGS, N. BENDAOU, M. MELLOUL and M. AMAR, Diversity of culturable moderately halophilic and halotolerant bacteria in a marsh and two salterns a protected ecosystem of Lower Loukkos (Morocco), *Afr. J. Microbiol. Res.*, 6 (10) (2012) 2419 - 2434
- [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] - 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
- [23] - P. VANDAMNE, B. POT, M. GILLIS, P. DEVOS, K. KERSTERS and J. SWINGS, Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics, *Microbiol. Rev.*, 60 (1996) 407 - 438
- [24] - A. VENTOSA, E. MELLADO, C. SANCHEZ-PORRO and M.C. MARQUEZ, Halophilic and Halotolerant Micro-Organisms from Soils. in P. Dion and C.S. Nautiyal (eds.). *Microbiology of Extreme Soils, Soil Biology 73*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2008) 87 - 115
- [25] - 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
- [26] - D. J. KUSHNER, Life in high salt and solute concentrations. In "Microbial Life in Extreme Environments", Ed. Academic Press, London, (1978) 317 - 368
- [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] - S. D'AMICO, T. COLLINS, J.C MARX, G. FELLER and C. GERDAY, Psychrophilic microorganisms: challenges for life, *EMBO Reports*, 7 (2006) 385 - 389
- [29] - 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
- [30] - A. ZAVALETA and A. M. CARDENAS-FERNANDEZ, Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes isolated from Pilluan a salt brine in Peru, *Halophiles-2007 Congress Booklet*, (2007) 50 - 51
- [31] - M. L. MORENO, E. MELLADO, M. T. GARCIA and A. VENTOSA, Diversity of extreme Halophiles producing hydrolytic enzymes in hypersaline habitats, *Halophiles-2007 booklet*, (2007) 59 - 60
- [32] - R. COJOC, S. MERCIU, P. GABRIELA, L. DUMITRU, M. KAMEKURA and M. ENACHE, Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal, *Roman. Biotechnol. Lett.*, 14 (2009) 4658 - 4664
- [33] - L. GOVENDER, L. NAIDOO and M. EVODIA, Isolation of hydrolase producing bacteria from a sun pan solar saltern and the production of endo1,4B xylanase from a newly is isolated haloalkaliphilic *Nesterenkonia sp.*, *Afr.J. Biotechnol.*, 8 (2009) 5458 - 5466
- [34] - R. ROHBAN, M. A. AMOOZEGAR and A. VENTOSA, Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolases from Howz Soltan Lake, Iran, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36 (2009) 333 - 340
- [35] - J. QUERELLOU. Biotechnologie des archées. *BIOFUTUR*, 310 (2010) 45 - 48
- [36] - 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
- [37] - C. SÁNCHEZ-PORRO, S. MELLADO, C. BERTOLDO, G. ANTRANIKIAN and A. VENTOSA, Screening and characterization of the protease CPI produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas sp.* strain CP76, *Extremophiles*, 7 (2003) 221 - 228

- [38] - A. H. KORANY, A. E. ALI, T. M. ESSAM and S. A. MEGAHEH, Optimization of Cellulase production by *Halobacillus* sp. QLS 31 Isolated from Lake Qarun, Egypt, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, (2017) 1 - 11
- [39] - 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
- [40] - A. GHANEM, Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure enriched compounds, *Tetrahedron*, 63 (8) (2007) 1721 - 1754
- [41] - 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
- [42] - 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
- [43] - 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
- [44] - 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
- [45] - 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
- [46] - 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
- [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. Biotechnol. Biochem.*, 69 (2005) 38 - 44
- [48] - 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
- [49] - 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
- [50] - 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
- [51] - 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
- [52] - 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 meridian*, *FEMS Microbiol Lett.* 183 (1) (2000) 67 - 71
- [53] - 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
- [54] - T. C. TAN, B. N. MIJTS, K. SWAMINATHAN, B. K. PATEL and C. DIVNE, Crystal structure of the polyextremophilic alpha-amylase AmyB from *Halothermothrix orenii*: details of a productive enzyme-substrate complex and an N domain with a role in binding raw starch, *J. Mol. Biol.*, 378 (4) (2008) 852 - 70
- [55] - 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

- [56] - A. OREN, Life at high salt concentrations, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry*. 3rd ed. Springer-Verlag, New York, (2006) 263 - 282
- [57] - 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
- [58] - 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
- [59] - R. KRISHNAN, A. PANNEERSELVAM, N. THAJUDDIN and A. ILAVARASI, Isolation and characterization of halophilic bacteria producing amylase and protease enzyme from marakkanam salt pan, *International Journal of Biological Research and Development IJBRD*, 7 (1) (2017) 1 - 8
- [60] - A. C. M. APOLO, M. A. R. CARVALHO, M. P. BEMQUERER, M. M. SANTORO, S.Q. PINTO, J. S. OLIVEIRA, K. V. SANTOS and L. M. FARIAS, Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by *Eikenella corrodens*, *J. Appl. Microbiol.*, 104 (2008) 508 - 514
- [61] - E. DÍAZ-TENAA, A. RODRÍGUEZ-EZQUERROA, L. N. L. L. MARCAIDEA, L. G. BUSTINDUYB and A. E. SÁENZB, Use of Extremophiles Microorganisms for Metal Removal, *Procedia Eng.* 63 (2013) 67 - 74
- [62] - I. G. MISHRA, S. SAPRE and S. TIWARI, Diversity of halophilic bacteria and actinobacteria from India and their biotechnological applications, *Indian J. Geomarine Sci.*, 46 (08) (2017) 1575 - 1587
- [63] - J. SOCHOR, O. ZITKA, D. HYNEK, E. JILKOVA, L. KREJCOVA, L. TRNKOVA, V. ADAM, J. HUBALEK, J. KYNICKY, R. VRBA and R. KIZEK, Bio-Sensing of Cadmium(II) Ions Using *Staphylococcus aureus*, *Sensors*, 11 (2011) 10638 - 10663
- [64] - 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
- [65] - Y. S. WONG, S. A. ONG, T. T. TENG, N. MINAH and K. KUMARAN, Production of Bioflocculant by *Staphylococcus cohnii ssp.* from Palm Oil Mill Effluent (POME), *Water Air Soil Pollut.*, 223 (2012) 3775 - 3781
- [66] - 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
- [67] - 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
- [68] - X. CHU, J. HAN, D. GUO, Z. FU, W. LIU and 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
- [69] - J. AGUSTIAN, A. H. KAMARUDDIN and H. Y. ABOUL-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
- [70] - 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 Health Dis.*, 13 (9) (2014) 1 - 9
- [71] - E. BACH, D. J. DAROIT, A. P. CORRÊA AND A. BRANDELLI, Production and properties of keratinolytic proteases from three novel Gram-negative feather-degrading bacteria isolated from Brazilian soils, *Biodegradation*, 22(6) (2011) 191-201

- [72] - S. L. WRANG, Y. H. CHIO, Y. H. YEN and C. L. WRANG, Two novel surfactant- stable alkaline protease from *Vibrio fluvialis* TKU 005 and their applications, *Enzyme Microb. Techn.*, 40 (2007) 1213 - 1220
- [73] - J. CHENG, S. HUANG, H. YU, Y. LI, K. LAU AND X. CHEN, Trans-sialidase activity of *Photobacterium damsela* $\alpha 2$, 6-sialyltransferase and its application in the synthesis of sialosides, *Glycobiology*, 20 (2) (2010) 260 - 268
- [74] - A. C. M. APOLONIO, M. A. R. CARVALHO, M. P. BEMQUERER, M. M. SANTORO, S. Q. PINTO, J. S. OLIVEIRA, K. V. SANTOS and L. M. FARIAS, Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by *Eikenella corrodens*, *J. Appl. Microbiol.*, 104 (2008) 508 - 514