

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République algérienne démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
جامعة عين تموشنت بلحاج بوشعيب
Université –Ain Temouchent- Belhadj Bouchaib
Faculté des Sciences et de Technologie
Département de Biologie



Projet de Fin d'Etudes
Pour l'obtention du diplôme de Master en sciences biologiques
Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée
Thème

**Isolement de certaines souches microbiennes
halophiles**

Présenté Par :

- 1) Melle. BOUGUENINA Roqiya
- 2) M. KARIMI Mostapha
- 3) M. MASTOR Abdessabor

Devant le jury composé de :

Dr. BOUAMRA M	MCA	UAT.B.B (Ain Temouchent) Président
Dr. CHIBANI H-R	MCA	UAT.B.B (Ain Temouchent) Examineur
Pr. ZIANE M	Professeur	UAT.B.B(Ain Temouchent) Encadrant

Année Universitaire 20203/2024

Sommaire

Remerciements	i
Dédicace	ii
Liste des figures	iii
Liste des tableaux	vi
Liste des abréviations	iv

Introduction	1
--------------	---

Synthèse bibliographique

1. 1. Généralités sur l'environnement salin	03
1. 1. 1. Définition de l'environnement salin	03
1. 1. 2. Composition ionique de milieu salin	03
1. 1. 3. Différent types de milieux salins	03
1. 1. 3. 1. Thalassohalin	04
1. 1. 3. 2. Athalassohalin	05
1. 1. 3. 3. Sebkha	06
1. 1. 4. Biodiversité microbienne des environnements salins	08
2. 1. Généralités sur les microorganismes halophiles	08
2. 1. 1. Phylogénie et caractéristiques phénotypiques des microorganismes halophiles	09
2. 2. Utilisation industrielle de microorganismes halophiles	11
2. 2. Différent espèces de micro-organismes halophiles	12
2. 3. 1. Champignon halophile	12
2.3.1.1 Diversités des champignons halophiles	12
2.3.1.2 Biomolécules Produites par des Champignons Halophiles	13
2. 2. 3. 2. Bactéries halophiles	15
2.3.2.1 Diversités des bactéries halophiles	15
2.3.2.2 Biomolécules Produites par des bactéries halophiles	17
2. 3. 3. Microalgues	18
2.3.3.1 Diversités des microalgues halophiles	18
2.3.3.2 Biomolécules Produites par des microalgues halophiles	20

MATERIEL ET METHODES

3. 1. Localisation géographique des régions d'étude	21
3. 2. Localisation des sites de de prélèvements	21
3. 3. Prélèvement des échantillons	24
3. 4. Préparation des échantillons	24
3. 4. 1. Enrichissement	24
3. 4. 2. Isolement des microorganismes halophiles	25
3. 4. 3. Conservation des isolats obtenues	25
3. 5. Caractérisation des isolats halophiles	25
3. 5. 1. Observation macroscopique des colonies	25
3. 5. 2. Observation microscopique	26
3. 5. 2. 1. Observation à l'état frais	26
3. 5. 2. 2. Coloration de Gram	26

3. 5. 3. Recherche des enzymes	26
3. 5. 3. 1. Catalase	26
3. 5. 3. 2. Oxydase	26
3. 5. 3. 3. Etude de métabolismes glucidiques	27
3. 5. 3. 3. 1. Technique classique	27
3. 5. 3. 3. 2. Recherche des enzymes	28
3. 5. 3. 3. 3. Autres tests complémentaires	28
3. 6. Analyse statistique des résultats	28

RESULTATS ET DISCUSSION

4. 1. Isolement des isolats halophiles	29
4. 2. Dénombrement des colonies des isolats halophiles	34
4. 3. Tests biochimiques	36

CONCLUSION	38
-------------------	-----------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

Remerciements

Il est des moments dans la vie qui marquent la fin d'une étape et le début d'une nouvelle aventure. L'obtention de ce diplôme de Master est l'un de ces moments précieux, et nous souhaitons exprimer notre profonde gratitude à ceux qui ont rendu ce voyage possible.

Tout d'abord, nous tenons à remercier chaleureusement encadreur de mémoire, Pr. ZIANE M, pour sa guidance, ses précieux conseils et sa disponibilité constante tout au long de la réalisation de ce travail. Son expertise et ses encouragements ont été des sources inestimables d'inspiration.

Nous remercions également les membres du jury Dr BOUAMRA M et Dr CHIBANI HR pour avoir pris le temps d'évaluer notre travail et pour leurs remarques constructives, qui ont permis d'enrichir cette recherche.

Un merci spécial à nos professeurs et à tout le corps enseignant de Université –Ain Temouchent- Belhadj Bouchaib, dont les enseignements et le soutien ont joué un rôle crucial dans notre parcours académique.

À nos collègues et amis, qui ont partagé cette aventure avec nous, merci pour votre amitié, votre soutien moral et les moments de partage. Vous avez rendu ce parcours bien plus agréable et enrichissant.

Nous ne saurions oublier nos proches, et particulièrement nos parents, pour leur amour inconditionnel, leur soutien financier et moral, ainsi que leur patience. Votre foi en nous a été un pilier essentiel de notre réussite.

Enfin, à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à ce projet, nous vous adressons nos plus sincères remerciements.

Ce diplôme est le fruit d'un effort collectif, et nous sommes profondément reconnaissants envers chacun d'entre vous.

Avec toute notre gratitude,

Melle. BOUGUENINA Roqiya et M. KARIMI Mostapha et M. MASTOR Abdessabor

Dédicace

Nous dédions ce mémoire à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à sa réalisation et à notre réussite.

À nos parents, pour leur amour inconditionnel, leur soutien sans faille et leurs encouragements constants. Vous avez toujours cru en nous et nous avez donné la force de poursuivre nos rêves. Ce mémoire vous est dédié.

À nos amis, pour leur amitié sincère, leur soutien moral et leurs précieux conseils. Votre présence à nos côtés a été une source de motivation et de réconfort tout au long de ce parcours.

À nos professeurs, pour leur passion pour l'enseignement, leur patience et leur dévouement. Vos enseignements ont nourri notre curiosité intellectuelle et nous ont guidés vers la réussite.

À tous ceux qui nous ont soutenus de près ou de loin, ce mémoire est aussi le vôtre. Votre influence positive et vos contributions ont été essentielles à la réalisation de ce travail.

Avec toute notre gratitude,

Melle. BOUGUENINA Roqiya et M. KARIMI Mostapha et M. MASTOR Abdessabor

Liste des figures

N°	Titre	Pages
Figure 01 :	Photos des plans thalassohalins : lac Dziani Dzaha, Île de Mayotte, Archipel des Comores situé dans l'océan Indien	04
Figure 02:	Mer Morte Dépôts de sel à la mer Morte près de Massada, Palestine	05
Figure 03 :	Oued El Melh, Tamazoura ,wilaya d'Ain Temouchent	22
Figure 04:	Sebkha d'Oran , Ain baida , wilaya d'Ain Temouchent	23
Figure 05:	Galerie API 10S	27

Listes des Tableaux

N°	Titre	Pages
Tableau 01 :	Distribution de quelques Sebkhia en Algérie	07
Tableau 02 :	Origine des échantillons étudiés dans cette étude	24
Tableau 03:	Description macroscopiques et microscopiques des isolats obtenus) partir de Sabkha d'Oran et Oued el Malh	31-33
Tableau 04 :	Niveau de contamination des échantillons analysés	34
Tableau 05 :	Distribution des genres identifiés dans les échantillons analysés	35
Tableau 06 :	Résultats des tests biochimiques de la galerie API 10S des isolats bactériens halophiles isolées de la Sebkhia de Ain Baida et Oued el Malh	37

Liste des abréviations

% : pourcentage
°C : Degres celcius
Kcal : kilo calories
Kg : kilogramme
mm: millimetre
AA: acide amine
Co : cobalt
ADN : Acide Désoxy-Ribonucleique
ARN : Acide Ribo-Nucleique
Etc : Etcetera
aw : activité en eau
pH : Potentiel d'hydrogenisation
sp : species : espèce non identifiée
spp : plusieurs espèces
kDa : Kilo dalton
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
OTA : Ochratoxine A
FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
U.V : ultra-violette
Mol : molécule
g : gramme
ZEN : zéaralénone
DL50 : dose létale médiane
AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments
mL : millilitre
µL : micro-litre
CFU: Colony Forming Unit (Unité formant colonie)
PDA: Potatoes Dextrose Agar
Eq : equation
CAM: Coconuts Agar Medium
CCM : chromatographie sur couche mince
YES: Yeast Extract Sucrose
SCE: somme des carrés des résidus

Résumé :

Les microorganismes halophiles constituent un groupe important d'extrémophiles en termes de distribution et de caractéristiques. Dans cette étude, l'ensemble des 11 échantillons sont analysés renferment des bactéries halotolérant . L'identification de ces bactéries s'était avérée difficile à déterminer à cause de leur caractéristique physiologique et biochimique spécifiques. Cette étude s'était contentée de déterminer seulement le groupe de ces microorganismes. 75% des isolats appartiennent au groupe de Bactéries lactiques et 25% des autres isolats appartiennent au deuxièmes groupes. Ces deux groupes sont très hétérogènes et demande des tests biochimiques complémentaires. Les résultats de cette étude ont montré une diversité phénotypique et biochimique. La diversité phénotypique et biochimique La diversité phénotypique et biochimique a été mise en évidence dans les résultats de cette recherche. Il a été démontré que ces bactéries ont le potentiel de produire des enzymes, notamment de la cellulose. Dans cette optique, ces isolats peuvent servir à des fins technologiques.

Mots clés : microorganisme halophile, halotolérant, sebkha, biotechnologie, application industrielle.

Abstract :

Halophilic microorganisms constitute an important group of extremophiles in terms of distribution and characteristics. In this study, all of the 11 samples analyzed contain halotolerant bacteria. The identification of these bacteria had proved difficult to determine because of their specific physiological and biochemical characteristics. This study was content to determine only the group of these microorganisms. 75% of the isolates belong to the group of lactic acid bacteria and 25% of the other isolates belong to the second groups. These two groups are very heterogeneous and require complementary biochemical tests. The results of this study showed phenotypic and biochemical diversity. Phenotypic and biochemical diversity Phenotypic and biochemical diversity have been highlighted in the results of this research. It has been shown that these bacteria have the potential to produce enzymes, in particular cellulose. With this in mind, these isolates can be used for technological purposes.

Keywords: halophilic microorganism, halotolerant, sebkha, biotechnology, industrial application.

الملخص

تشكل الكائنات الحية الدقيقة المحبة للملوحة مجموعة مهمة من المتطرفين من حيث التوزيع والخصائص. في هذه الدراسة ، تحتوي جميع العينات الـ 11 التي تم تحليلها على بكتيريا متحملة للهالات. وقد ثبت أن تحديد هذه البكتيريا صعب التحديد بسبب خصائصها الفسيولوجية والكيميائية الحيوية المحددة. كانت هذه الدراسة راضية عن تحديد مجموعة هذه الكائنات الحية الدقيقة فقط. تنتمي 75 ٪ من العزلات إلى مجموعة بكتيريا حمض اللاكتيك و 25 ٪ من العزلات الأخرى تنتمي إلى المجموعات الثانية. هاتان المجموعتان غير متجانسة للغاية وتتطلبان اختبارات كيميائية حيوية تكميلية. أظهرت نتائج هذه الدراسة التنوع المظهري والكيميائي الحيوي. التنوع المظهري والكيميائي الحيوي تم تسليط الضوء على التنوع المظهري والكيميائي الحيوي في نتائج هذا البحث. لقد ثبت أن هذه البكتيريا لديها القدرة على إنتاج الإنزيمات ، وخاصة السليلوز. مع وضع ذلك في الاعتبار ، يمكن استخدام هذه العزلات للأغراض التكنولوجية.

الكلمات المفتاحية: الكائنات الحية الدقيقة المحبة للملوحة ، هالوتوليرانت ، سبخة ، التكنولوجيا الحيوية ، التطبيق الصناعي.

INTRODUCTION

Introduction

Les microorganismes extrémophiles sont effectivement capables de se développer dans des environnements extrêmes, tels que ceux caractérisés par des températures élevées ou basses, des niveaux élevés de salinité, des pH extrêmes, et des pressions hydrostatiques importantes. Ces microorganismes appartiennent aux trois domaines de la vie, notamment les archées, les bactéries, et quelques eucaryotes primitifs. La recherche sur les microorganismes extrémophiles est actuellement un sujet d'intérêt majeur en raison de leur potentiel biotechnologique. De nombreuses enzymes et molécules produites par ces microorganismes sont stables sous des conditions extrêmes, ce qui peut avoir des applications industrielles telles que dans l'industrie des détergents, l'agroalimentaire, et la production de biocarburants (**Quérellou et al., 2010**).

Les environnements hypersalins sont des environnements exceptionnels caractérisés par un niveau de salinité élevé. Ils se trouvent à divers endroits, tels que les zones côtières et les bassins sédimentaires. Ces environnements ont des particularités qui leur sont propres, notamment une forte concentration en sel, ainsi qu'une présence abondante de microorganismes halophiles. Ces derniers sont capables de vivre dans des conditions extrêmes et jouent un rôle crucial dans l'écosystème hypersalin en interagissant avec leur environnement et en participant aux cycles biogéochimiques. Les études menées sur ces microorganismes ont permis de mieux comprendre l'adaptation des organismes vivants à leur environnement et pourraient également avoir des applications potentielles dans le domaine industriel.

Les halophiles sont des organismes extrémophiles représentés par des archées, des bactéries et des eucaryotes qui prospèrent dans un environnement hypersalin. Ils appliquent différentes stratégies d'osmoadaptation pour survivre dans des conditions hostiles. La diversité des habitats des microorganismes halophiles dans le système hypersalin fournit des informations sur l'évolution de la vie sur Terre (**Ventosa et al., 2015**).

Les micro-organismes halophiles représentent une source potentielle de molécules nouvelles, des substances osmotiquement actives (solutés compatibles), protéines, enzymes extracellulaires, des lipides spéciaux et des exo polysaccharides, dans ce concept ils constituent de véritables candidats pour de nombreuses applications biotechnologiques et industrielles dans plusieurs domaines : médical, pharmaceutique, alimentaire, agronomique et industriel. Certaines de ces applications datent de plusieurs siècles et existaient bien avant que les aspects microbiologiques et que des processus ne soient compris (**Oren, 2010**).

Notre travail actuel se présente sous la forme d'une revue bibliographique visant à offrir une vue d'ensemble sur les microorganismes halophiles. Il est structuré en trois parties distinctes :

1. Introduction aux environnements salins et hypersalins
2. Exploration des microorganismes halophiles, de leur diversité phylogénétique, ainsi que de leur adaptation osmotique aux fortes concentrations de sel.
3. Un aspect pratique d'isolement et purification des souches des microorganismes halophiles et Détermination de profile biochimiques des isolats

Synthèse bibliographique

1. 1. Généralités sur l'environnements salins

Les environnements extrêmes qui abritent des microorganismes extrémophiles comprennent les températures élevées, les basses températures, le pH alcalin, le pH acide, une concentration élevée de sel, une faible disponibilité d'eau et une pression hydrostatique élevée (Schmitz et al., 2023).

1. 1. 1. Définition de l'environnement salins

Les environnements salins et hypersalins sont des écosystèmes uniques caractérisés par des concentrations de sel extrêmes. Ces environnements peuvent se produire naturellement dans les régions arides et semi-arides ou notamment à la suite du rejet d'eaux usées hautement salines provenant d'installations industrielles (Barbafieri et al., 2023).

1. 1. 2. Composition ionique de milieu salin

La composition ionique (en sel) est un facteur clé pour déterminer le biotope de l'environnement. En effet, les environnements salins ou hypersalins sont essentiellement caractérisés par leur concentration totale très élevées (et al., 2006). Plusieurs ions peuvent être existé comme :

- Anions (Chlore : Cl^- , Bromure : Br^- , Fluor : F^- , Sulfate : SO_4^{2-} ...etc.) ;
- Cations (Calcium : Ca^{2+} , Fer : Fe^{2+} et Fe^{3+} , Magnésium : Mg^{2+} , Potassium : K^+ , Sodium : Na^+ , Lithium : Li^+ ...etc.) ;
- Molécules organiques (acétate, carbonate, citrate, nitrate) (Toffin et al., 2020).

Les deux principaux ions sont Na^+ et Cl^- qui en s'associant forment le chlorure de sodium (NaCl).

1. 1. 3. Diffèrent types de milieux salins

Les milieux salins peuvent être classés selon plusieurs critères, notamment leur origine, leur composition chimique et leur niveau de salinité. Voici les principales catégories de milieux salins:

1. 1. 3. 1. Thalassohalin

. Le terme “thalassohalin” fait référence à un environnement salin qui est en contact avec l’eau de mer. Il est souvent utilisé pour décrire des lacs, des lagunes ou des milieux aquatiques situés près des côtes et qui présentent une salinité élevée due à la présence d’eau de mer. L’un des exemples mentionnés dans vos précédentes conversations est le Dziani Dzaha, un lac de cratère thalassohalin situé sur l’île de Petite-Terre dans l’archipel de Mayotte, ’analyse des gaz magmatiques émis au niveau du lac Dziani Dzaha a mis en évidence une hausse de 40 cm du niveau du lac ainsi qu’une diminution de la salinité (de 65 à 55 psu). Cet événement d’entrée d’eau de mer dans le lac est une opportunité unique et inattendue de comprendre comment les communautés microbiennes réagissent face à des changements drastiques du milieu. Trois catégories de réponses fonctionnelles de l’écosystème microbien peuvent être attendues : la résistance, la résilience ou l’apparition d’un état stable alternatif (Cadeau, P,2023).



© Élodie Foucault Ifremer MARBEC, Lac Dziani Dzaha

Figure 01 : Photos des plans thalassohalins : lac Dziani Dzaha, Île de Mayotte, Archipel des Comores situé dans l’océan Indien (Cadeau, 2023)

1. 1. 3. 2. Athalassohalin

Le terme “Athalassohalin” fait référence à un environnement qui est à la fois hypersalin et hautement alcalin. Un exemple typique d’un tel environnement est un lac de soude.

L’exemple parfait d’un écosystème hypersalin athalassohalin est la mer Morte, un lac dans lequel la concentration des cations divalents Mg^{2+} et Ca^{2+} (1.89 M et 0.45 M respectivement) dépasse celle des cations monovalents Na^{+} et K^{+} (1.56 M et 0.2 M respectivement), et dans lequel le pH est relativement bas (environ 6.0) (**Oren, 2002**).



Figure 02: Mer Morte Dépôts de sel à la mer Morte près de Massada, Palestine.

(Pletcher,2024)

1. 1. 3. 4. Sebkha

Sebkha est un sol plat salin et évaporatif qui se forme sous et sous les climats. Il est généralement associé à des nappes phréatiques saturées très proches de la surface du sol. Il existe généralement deux principaux types de sebkhas :

- **Sebkha côtier** : Elle est créée à partir de sédiments marins et continentaux lorsque la mer se retire avec la marée et s'éloigne de la terre. Elles se forment dans la zone supratidale, où l'eau de mer inonde par intermittence, provoquant la saturation des sols et des sédiments et l'évaporation des sels (**Hafhouf, 2022**).
- **Sebkha continentale ou intérieure** : Elle est appelée aussi sebkha solitaire. Elle se forme à l'intérieur des terres, loin du bord de mer, dont leur niveau est proche de celui de la nappe phréatique. Elle est formée suite à changement de climat ou grâce à des événements géologiques. Elle est riche en $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, le quartz, le SiO_2 , le carbonate de calcium, le CaCO_3 et les minéraux salins NaCl dans la couche solide supérieure des Sebkha (**Perthuisot, J. P, 1976**).

Ce type de l'environnement salins est très répandu en Algérie comme montre le Tableau 1.

Tableau 01 : Distribution de quelques Sebkhia en Algérie.

Nom	Province/climat	Coordonnée spatial	Superficie/Volume	Salinité	Composition ionique	Références
Sebkhia d'Oran	Oran/semi-aride	35°31'N 00°47'W	56'870 ha	1,14 g à 8,91 g/l (d'eau)	RS, Cl ⁻ , SO ₄ ⁻ , HCO ₃ ⁻ , NO ₃ ⁻ , Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Na ⁺ , K ⁺	Nabila (2014)
Chott el Hodna	M'Sila,Batna/aride	35°26'N 04°41'E	362'000 ha	0.5 to 280g/l(de l'eau)	Na , K , Ca , Mg , So ⁴ H ²	Belagoune (2013)
Sebkhia de Melrhir	Biskra, El Oued et Touggourt/chaud et aride	34.333°N 6.333°E	67,000 ha	400 g/L. (d'eau)	Ca ⁺² , Mg ⁺² ,So ₄ ⁻² , HCO ₃ ⁻ , Cl ⁻ , NaCl ⁻	Remli (2018)

1. 1. 4. Biodiversité microbienne des environnements hypersalins

Les habitats hypersalins sont parmi les habitats les plus polyextrêmes sur Terre, mais ils contiennent une assez grande diversité d'espèces microbienne.

Le modèle actuellement accepté de la structure de la communauté dans les environnements hypersalins est que *l'archéon carré Haloquadratum waslbyi*, le *bacteroidete Salinibacter ruber* et *nanohaloarchaea* sont des membres prédominants à des concentrations de sel plus élevées, tandis que des taxons archéens et bactériens plus diversifiés sont observés dans des habitats avec des salinités intermédiaires. De plus, des études métagénomiques peuvent donner un aperçu de l'isolement et de la caractérisation des principaux microbes dans ces habitats, comme la *gammaproteobacterium Spiribacter salinus* récemment décrite (Ventosa et al., 2015).

Bien que seul un nombre limité d'études sur la diversité microbienne des sols salins aient été réalisées, les lacs hypersalins et les marais salants marins ont fait l'objet d'une enquête approfondie, ce qui a permis d'acquérir des connaissances biaisées sur la vie dans les environnements hypersalins. Pour améliorer notre compréhension de l'assemblage des microbes prospérant dans les sols salins, nous avons évalué la diversité phylogénétique et le potentiel métabolique de la communauté procaryote de deux sols hypersalins contenant des séquences apparentées à la fois à des halophiles connus et à des groupes sans représentants halophiles ou halotolérants connus, ce qui reflète l'hétérogénéité physique de la matrice du sol. Nos résultats suggèrent que *Haloquadratum* et certains membres de *Balneolaeota* peuvent préférentiellement prospérer dans des habitats aquatiques ou terrestres, respectivement, tandis que *haloarchaea*, *nanohaloarchaea* et *Salinibacter* peuvent être adaptés de manière similaire aux deux environnements. Ont été construits 4 projets de génomes liés aux Bacteroidetes, Balneolaeota et *Halobacteria* et ont évalué leur métabolisme, leurs stratégies d'osmoadaptation et leur écologie. Cette étude améliore grandement la compréhension actuelle du microbiote des sols salins (Vera-Gargallo, 2018).

2.1 Généralités sur les microorganismes halophiles

Les microorganismes halophiles ont développé des mécanismes adaptatifs pour faire face au stress osmotique, tels que l'accumulation de sel, l'oxydation et la modification du volume

cellulaire. Ils surmontent également les conditions de stress telles que la résistance aux antibiotiques, les métaux lourds et les liquides ioniques. Ces microorganismes ont une large gamme de diversité physiologique, y compris des phototrophes oxygéniques et anoxygéniques, des hétérotrophes aérobies et ceux capables de divers métabolismes respiratoires anaérobies. Les nanomicroorganismes se trouvent également dans des environnements salins et sont des candidats prometteurs pour des applications biotechnologiques telles que la production de pigments, la production de biopolymères, les enzymes hydrolytiques tolérantes au sel, la biorestauration, la conservation des aliments et les aliments fermentés. La compréhension des halophiles ouvre également la voie à la recherche astrobiologique. (Dam, B, 2023).

2.1.1 Phylogénie et caractéristiques phénotypiques des microorganismes halophiles

Les bactéries modérément halophiles sont des microorganismes qui se développent de manière optimale dans des milieux contenant 3% à 15% (p / v) de sel. Ils sont représentés par un groupe hétérogène de microorganismes appartenant à de nombreux genres différents. Les bactéries à Gram négatif modérément halophiles ont été étudiées plus en détail, mais les études sur les espèces à gram positif sont plus rares. Des études récentes menées par notre groupe de recherche sur les halophiles modérés à gram positif ont permis de clarifier leur position taxonomique et phylogénétique et de décrire de nouvelles espèces (Ventosa, A. et al .1998)

La diversité phylogénétique des microorganismes vivant à des concentrations élevées de sel est surprenante, avec des halophiles trouvés dans les Archées, les bactéries et les Eucaryas. Ces microorganismes ont une grande diversité métabolique, y compris des phototrophes oxygénés et anoxygènes, des hétérotrophes aérobies, des fermenteurs, des dénitrifiants, des réducteurs de sulfate et des méthanogènes. La diversité des types métaboliques diminue avec la salinité, et la limite supérieure de la salinité est corrélée à la production d'énergie et aux coûts d'adaptation osmotique. Des études récentes ont amélioré notre compréhension de la biodiversité dans les environnements saturés en sel à l'aide de techniques de culture, de méthodes de biologie moléculaire et d'études chimiotaxonomiques. Les microorganismes halophiles sont exploités en biotechnologie, certains produits étant directement liés à leur comportement halophile. (Oren, 2002).

Les Archées halophiles de la famille des Halobacteriaceae (36 genres avec 129 espèces classées dans la nomenclature en novembre 2011) fournissent un excellent exemple de la façon dont l'évolution des concepts sur la taxonomie procaryote et le développement de nouvelles méthodes ont influencé la manière dont la taxonomie d'un seul groupe de procaryotes est traitée. Cette revue donne un aperçu de la taxonomie de la famille des *Halobactériacées*, montrant l'impact que les méthodes de caractérisation phénotypique, de taxonomie numérique, de *chimiotaxonomie* et surtout d'analyse lipidique polaire, de comparaisons de séquences géniques d'ARNr 16S, d'analyse de type multilocus et de génomique comparative ont eu sur leur classification (**Andrei et al., 2012**).

La famille des Halobactériacées contient actuellement 96 espèces dont les noms ont été valablement publiés, classés en 27 genres (en septembre 2008). Au cours des dernières années, de nombreuses espèces nouvelles ont été ajoutées aux genres établis, mais, dans de nombreux cas, une ou plusieurs propriétés des espèces nouvelles ne concordent pas avec les descriptions publiées des genres. Les auteurs ont souvent omis de fournir des descriptions de genre modifiées lorsque cela était nécessaire. Pour donner suite aux discussions du Sous-Comité sur la Taxonomie des Halobactériacées du Comité International de Systématique des Procaryotes, nous proposons ici des descriptions corrigées des genres *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halorubrum*, *Haloterrigena*, *Natrialba*, *Halobiforma* et *Natronorubrum* (**Oren, 2009**).

2. 2. Utilisation industrielle de microorganismes halophiles

Les environnements salins sont des habitats extrêmes sur la planète et ont une population microbienne diversifiée formée de microorganismes halophiles. Ils sont considérés comme des sources réelles ou potentielles de découverte de composés bioactifs, de solutés compatibles, y compris de nouvelles enzymes et / ou extraordinairement enzymes. À ce jour, un certain nombre de composés bioactifs destinés à être utilisés dans divers domaines de la biotechnologie qui présentent des activités biologiques variées allant des actions antioxydantes, solaires et antibiotiques ont été signalés. De plus, certains microorganismes halophiles sont capables de produire des quantités massives de solutés compatibles qui sont utiles comme stabilisants pour les biomolécules ou les agents de protection contre le stress (**Waditee-Sirisattha et al., 2016**).

2. 3. Différent espèces de micro-organismes halophiles

2. 3. 1. Champignon halophile

Les champignons halophiles sont un groupe de champignons présents dans les environnements salins, avec des concentrations de sel allant de faibles à élevées. Ils ont été identifiés et isolés par des chercheurs du monde entier (**Amani et al., 2023**). Ces champignons se sont adaptés aux conditions salines en augmentant la teneur en acides aminés acides de leurs protéines, comme c'est le cas pour les procaryotes (**Soufleros et Bertrand, 2015**). On a découvert qu'ils avaient diverses applications biotechnologiques, notamment la production de divers métabolites et enzymes industrielles telles que la protéase, l'amylase et la cellulase (**Baker et Rutter, 2023 ; Beck et al., 2015**). Il a également été rapporté que les champignons halophiles jouent un rôle dans les processus de biorestauration, tels que la dégradation du phénol, l'élimination des métaux lourds et l'assainissement des sols salins (**Zhang et al., 2021**).

2.3.1.1 Diversités des champignons halophiles

- *Gymnoascus halophilus*

Gymnoascus halophilus présentait des caractéristiques morphologiques typiques du genre, c'est-à-dire des colonies jaunes, des ascomates sphériques jaunâtres à bruns et des ascospores aplaties et pigmentées, Bien que le téléomorphe *G. Stercuraeus* n'ait pas été observé, il avait des colonies jaunes et des structures anamorphiques (c'est-à-dire des spores d'arthroconidies et de chlamydia) typiques des espèces de gymnospermes. Dans la souche dérivée de nocicepteurs de 18 et 28 secondes, C. Halovy Luce, J. Stercoraux et C. Les thermotollères se rassemblaient bien dans le clade des gymnospermes originalis et étaient génétiquement distincts les uns des autres et de toutes les autres espèces connues. Les espèces de gymnospermes sont traditionnellement déterminées par des caractères morphologiques tels que la forme, la taille et la coloration des Orna des ascospores. Avec l'inclusion des espèces précédentes (**Zhou et al., 2016**).

- *Hortaea werneckii*

Hortaea werneckii est une levure noire avec une tolérance remarquable au sel. La plupart des études ont été consacrées à la compréhension de la façon dont *H. werneckii* s'adapte aux environnements hypersalins. *H. werneckii* a un cycle cellulaire non conventionnel dans lequel il alterne entre la fission et le bourgeonnement, qui est modulé par la densité cellulaire. De plus, *H. werneckii* peut provoquer une mycose superficielle de la paume et de la plante des pieds des humains. Ici, l'impact de la concentration en sel sur le modèle de division cellulaire et la morphologie de la souche, en effectuant une microscopie accélérée à différentes concentrations de sel. À faible densité et sans sel, la souche pousse principalement sous forme de *pseudohyphes* se divisant principalement par cloisonnement. Lorsqu'il est cultivé en présence de sel à une concentration similaire à celle de l'eau salée ou des environnements hypersalins (**Anthoines et Vargas-Muñiz, 2022**).

2.3.1.2 Biomolécules Produites par des Champignons Halophiles

Les champignons des habitats salins sont une source d'abondance de biocomposés avec des applications industrielles potentielles, qui ont des caractéristiques uniques telles que la tolérance au sel, la stabilité et l'activité en présence de solvants organiques et dans des conditions de faible activité de l'eau.

Les champignons halophiles produisent diverses enzymes, principalement connues pour leurs propriétés hydrolytiques et ligninolytiques. Les mécanismes de défense contre le stress oxydatif font des halophiles une riche source de solutés ou d'osmolytes compatibles, notamment le glycérol, l'arabinitol, l'érythritol, les mycosporines et les acides aminés de type mycosporine (MAAs).

Les environnements salins représentent les vastes ressources naturelles de biosurfactants fongiques et de protéines tensioactives telles que les hydrophobines. Les microorganismes halophiles, y compris les champignons, peuvent également produire des pigments. Les champignons mélanisés de type levure noire et apparentés accumulent de la mélanine dans leurs cellules pour protéger la cellule des conditions difficiles. De plus, ils sont considérés comme producteurs de composés antimicrobiens et anticancéreux d'importance pharmaceutique et d'antioxydants pour la prévention alimentaire et l'industrie cosmétique. Des champignons halophiles sont encore découverts et de nouveaux composés sont décrits tout le temps (**Śliżewska et al., 2022**).

Les champignons halophiles, tels que *Trimmatostroma salinum*, *Wallemia ichthyophaga*, *Hortaea werneckii* et *Phaeothea triangularis*, offrent de précieux composés bioactifs, enzymes et protéines pour diverses industries. Leurs enzymes, telles que les amylases, les cellulases, les lipases et les protéases, possèdent une polyextrémophilie, ce qui en fait une nouvelle alternative catalytique pour les applications biotechnologiques. Une méthode conventionnelle utilisant un homogénéisateur mécanique et une nouvelle méthode utilisant la technologie supercritique ont été utilisées pour libérer ces enzymes des cellules fongiques. Des concentrations élevées de protéines ont été détectées dans toutes les suspensions de cellules fongiques halophiles après traitement au SC CO₂, et les enzymes des extrémophiles ont des propriétés améliorées et peuvent être utilisées dans des conditions difficiles où les enzymes non extrémophiles peuvent se désactiver. Ces endozymes sont des enzymes tolérantes à la haute pression adaptées à diverses applications industrielles, qui peuvent également être réalisées dans des milieux non aqueux comme le SC CO₂.(Diallo et al., 2023).

2. 3. 2. Bactéries halophiles

Les bactéries halophiles peuvent peupler toutes les niches de la terre. Ces halophiles ont un grand potentiel de production d'exopolysaccharides qui revêt une importance considérable dans diverses industries. Pour cribler les EPS produisant des halophiles, la production d'EPS a été analysée quantitativement et qualitativement. Des espèces isolées de staphylocoques et de bacilles ont produit une grande quantité d'EPS (20g/L). Les "halophiles modérés" jouent un rôle important dans les industries de la thérapeutique, de la biorestauration, de l'alimentation et de la médecine, du pétrole et du bronzage en produisant des EPS. Récemment, la croissance de nombreuses cultures agricoles a été améliorée en utilisant des halophiles bénéfiques dans les sols salins. Par conséquent, avec l'aide de ces halophiles bénéfiques, nous pouvons apporter des avantages à l'humanité (Laraib et al.,2022).

2.3.2.1 Diversités des bactéries halophiles

- ***Halobacillus salinus***

De nouvelles bactéries algériennes Gram-positives, en forme de bâtonnet, formant des endospores, philiques salines (souche DZ28) qui surproduisent des protéases alcalines

extracellulaires ont été isolées à partir de dépôts de lacs salés dans le lac Oubeira, El Taref. La souche DZ28 a été désignée *Halobacillus salinus* DZ28 sur la base des propriétés phénotypiques et du séquençage du gène de l'ADNr 16S (ribotypage). L'activité protéase maximale enregistrée après 36 heures d'incubation dans un milieu optimisé à 30 ° C était de 19 000 U / ml dans une culture en flacon secouant à 160 tr / min. La protéase d'extrait brut a montré une activité optimale à une température de 60 ° C et un pH de 12. Il est activement inhibé par PMSF et DIFP, indiquant qu'il appartient à la famille des sérine protéases. Fait intéressant, la protéase d'extrait brut était non seulement très stable aux tensioactifs et oxydants non ioniques, mais présentait également une stabilité et une compatibilité élevées avec certains détergents commerciaux (**Medjekal et al., 2023**).

- ***Halorubrum***

Un nouvel archéon extrêmement halophile, la souche RHB-CT, a été isolé dans un étang de saumure à Bolinao, Pangasinan, Philippines. Les colonies étaient pigmentées rouge orangé, lisses, convexes et rondes sur un milieu de croissance modifié solide contenant 25% de sels totaux. La souche était gram négatif, mobile et strictement aérobie. Il augmentait avec les concentrations de NaCl, un pH de 6,5 à 8,5 et une température de 20 à 55°C. La phylogénie du gène de l'ARNr 16S a révélé que la souche appartient au genre *Halorubrum* et est apparentée à d'autres espèces comme *Halorubrum xinjiangense*, *Halorubrum sodomense*, *Halorubrum coriense*, *Halorubrum trapanicum* et *Halorubrum Oil Distribution*. Les séquences du gène *rpoB* ' ont également montré que la souche est liée à d'autres espèces. La teneur en ADN G + C de la souche RHB-CT était de 68,7% molaire. Sur la base des valeurs de dDDH et d'ANI, des différences morphologiques et physiologiques significatives par rapport aux taxons connus suggèrent que la souche RHB-CT représente une nouvelle espèce du genre *Halorubrum*, avec le nom *Halorubrum salinarum* sp. novembre. (**Han, H et al., 2022**).

2.3.2.2 Biomolécules Produites par des bactéries halophiles

Les polyhydroxyalcanoates (PHA) sont des polyesters microbiens produits par de nombreux procaryotes. Ces matériaux sont généralement considérés comme des alternatives renouvelables et biodégradables aux polymères pétrochimiques dans de nombreuses applications. Les PHA sont accumulés par les cellules microbiennes sous forme de granules intracellulaires principalement comme composés de stockage ; néanmoins, de nombreux rapports récents soulignent également l'importance des PHA pour la robustesse au stress des bactéries. Par conséquent, dans cette revue, nous nous concentrons sur la synthèse des connaissances actuelles sur l'accumulation de PHA chez les halophiles et les thermophiles - microorganismes procaryotes adaptés à une salinité élevée et à une température élevée, respectivement. L'utilisation d'extrémophiles pour la production de PHA apporte de nombreux avantages découlant en particulier de la robustesse accrue du processus contre la contamination par la microflore mésophile commune en tant que fondement du concept de biotechnologie industrielle de nouvelle génération. De plus, les progrès récents et les perspectives en ingénierie métabolique et en biologie synthétique des halophiles et des thermophiles pour l'amélioration de la production de PHA sont également résumés et suggérés. Les faits et les idées recueillis dans cette revue promettent que la production biotechnologique de PHA par les extrémophiles peut être durable et économiquement réalisable, ce qui permettra à PHA d'entrer massivement sur le marché et de concurrencer les polymères pétrochimiques non biodégradables dans des applications appropriées (**Obruča et al., 2022**).

Les sources microbiennes sont la meilleure source pour la production en vrac de ces enzymes. Et Cependant, leur administration à long terme peut provoquer des réponses immunologiques, il est donc nécessaire de rechercher de nouvelles enzymes dotées de nouvelles propriétés.

2. 3. 3. Microalgues

Les microalgues halophiles sont un groupe de microorganismes capables de se développer dans des environnements extrêmes à forte salinité. Ils se sont adaptés pour survivre dans des environnements tels que les étangs salés solaires, les lacs salés naturels et les sédiments à forte teneur en sel (**Bagchi et al.,2023**).

Ces microalgues ont la capacité de tolérer des conditions défavorables et peuvent bien se développer en cas de modification des conditions environnementales, telles que des températures élevées ou basses, des niveaux de pH et une pression, Les microalgues halophiles offrent des applications potentielles dans divers domaines, notamment la biotechnologie industrielle, la production de biocarburants, la production d'enzymes, l'extraction de pigments et le traitement des eaux usées (**Sánchez-Porro,2023**).

Les microalgues halotolérantes et halophiles ne sont pas continués. La présence de salinités non optimales réduit la productivité globale de la biomasse sous une salinité accrue. Pour atteindre une biomasse élevée à des salinités non optimales (**Ishika et al., 2019**).

2.3.3.1 Diversités des microalgues halophiles

- ***Dunaliella salina* :**

Les cellules de *Dunaliella* ont été identifiées pour la première fois par Michael F. Bonal (Bonal, Citation 1838) dans des marais salants du sud de la France et décrites comme des algues unicellulaires rougeâtres. En 1905, Emanoil C. Teodorescu a proposé le genre (Teodoresco, Citation 1905). Une caractéristique distinctive de ces microalgues est leur haute résistance à divers facteurs environnementaux, et il existe donc une grande diversité de souches disponibles pour l'industrie. L'étude de souches particulières a permis de mieux comprendre les mécanismes physiologiques d'adaptation à une salinité élevée, un pH bas et une large gamme de températures. De nombreuses espèces de *Dunaliella* ont été isolées dans des environnements à forte salinité et à une large gamme de concentrations d'autres composants chimiques. Morphologiquement, les cellules de *Dunaliella* sont biflagellées, peuvent être ovoïdes, sphériques, pyriformes, fusiformes ou ellipsoïdales, et peuvent varier entre 5 et 25 µm de longueur et 3 à 13 µm de largeur. Ces cellules

n'ont pas de paroi cellulaire rigide, étant délimitées par une membrane mince et élastique qui permet une adaptation morphologique plus efficace, en fonction des variations de pression osmotique de l'environnement extérieur. Les cellules contiennent un seul chloroplaste central en forme de coupe avec un pyrénioïde central entouré de grains d'amidon (**Fleurence, 2023**).

Les cellules de *Dunaliella* se multiplient par division longitudinale, et la reproduction sexuée par isogamie peut se produire, où deux cellules fusionnent, formant un zygote. Il a également été démontré que ces cellules peuvent conduire à la formation de cellules *palmelloïdes* ou aplanospores, si les conditions environnementales inhibent la croissance (**Barbosa et al., 2023**).

- **La spiruline :**

La spiruline, ou ce qui était très probablement *l'Arthrospira*, est une microalgue photosynthétique, filamenteuse, en forme de spirale, multicellulaire et bleu-vert qui a une longue histoire d'utilisation comme aliment. Car ce microorganisme contient de la chlorophylle a, comme les plantes supérieures, les botanistes le classent comme une microalgue appartenant à la classe des *Cyanophycées* ; mais selon les bactériologistes c'est une bactérie en raison de sa structure procaryote, La spiruline, essentiellement un extrait simple exceptionnel d'algues bleu-vert, a été largement étudiée et est maintenant largement utilisée dans le monde entier comme produit alimentaire et comme complément alimentaire, Ceci est attribué à des facteurs environnementaux tels que la température et d'autres facteurs physiques et chimiques et peut-être aussi à des changements génétiques. Les observations au microscope électronique à transmission montrent l'organisation procaryote de la spiruline, la capsule, la paroi cellulaire pluristratifiée, le système lamellaire photosynthétique ou thylakoïde, les ribosomes et les fibrilles de la région de l'ADN et de nombreuses inclusions. La capsule a une structure fibrillaire et recouvre chaque filament qui la protège. La présence irrégulière de capsule autour des filaments chez *S. platensis* est une caractéristique morphologique différenciante à comparer avec *S. maxima* (**Koru, 2012**).

2.3.3.2 Biomolécules Produites par des microalgues halophiles

Algae exhibit distinguishing potential of producing various products from fuels to wide range of value-added products, described in the present book as phycochemicals. Few decades of research analyzed several pathways of converting microalgal biomass into bioproducts. The product conversion efficiency, sustainability, and economics of the production processes depend on the type of reactions opted and catalyst used for producing the targeted product. Catalyst plays vital role in overall economics and yield of the target product (**Esakkimuthu, S. et al., 2023**).

La production de produits à valeur ajoutée à partir de digestat anaérobie de déchets est économiquement et écologiquement importante pour le développement durable des procédés et des produits industriels. Dans cette étude, des microalgues halophiles, *Chlorella vulgaris* 92001, *Chlorella vulgaris* 50291, *Chlorella vulgaris* 10241 et *Tetraselmis indica*, ont d'abord été criblées pour la production de lutéine en utilisant du digestat laitier synthétique (DD), du digestat municipal (MD) et du digestat de volaille (PD) comme substrats gratuits. Le criblage et l'optimisation des paramètres, tels que la dilution, le pH, le MgCl₂, le NaCl, le NaHCO₃ et la concentration de l'inoculum pour une production maximale de lutéine ont ensuite été effectués en utilisant la méthodologie de Plackett-Burman et de surface de réponse statistiquement conçue. (**Ramasamy, S et al.2023**).

MATERIEL ET METHODES

La partie pratique de ce travail a été réalisé dans le laboratoire pédagogique de département de Biologie, Faculté des sciences et technologie, Université de Ain Témouchent, durant la 20/02/2024 au 20/03/2024.

3. 1. Localisation géographique des régions d'étude

Ain Temouchent est une ville côtière (long de la mer Méditerranée) située dans la région de l'ouest de l'Algérie. Elle se trouve à environ 400 kilomètres à l'ouest d'Alger, la capitale du pays.

Du point de vue géographique, Ain Temouchent est située entre les montagnes de l'Atlas tellien et la mer Méditerranée. En termes de coordination géographique, Ain Temouchent se trouve approximativement aux coordonnées 35° 19' 48" de latitude nord et 1° 17' 24" de longitude ouest. Cependant, il convient de noter que ces coordonnées sont fournies à titre indicatif et peuvent varier légèrement selon les sources.

La localisation de la wilaya d'Ain Temouchent est située en Oranie et limitée à l'est par la wilaya d'Oran, au sud-est par la wilaya de Sidi Bel Abbés, au sud-ouest par celle de Tlemcen et au nord-ouest par la Méditerranée qui la borde sur une distance de 80 km.

3. 2. Localisation des sites de de prélèvements

Les prélèvements ont été effectués à partir de plusieurs zones géographiques de la région de Ain Témouchent (Figure 03).

Site N°1 :

Oued El Melh est une source d'eau essentielle située dans la wilaya d'Ain Temouchent, plus précisément de village d'Aghball et de Ain Baida relevant respectivement de la commune de Tamazoura et de Hamam Bouhadjar. Ce cours d'eau traverse la région aux coordonnées 35.45572,-0.598909 (Figure 04).

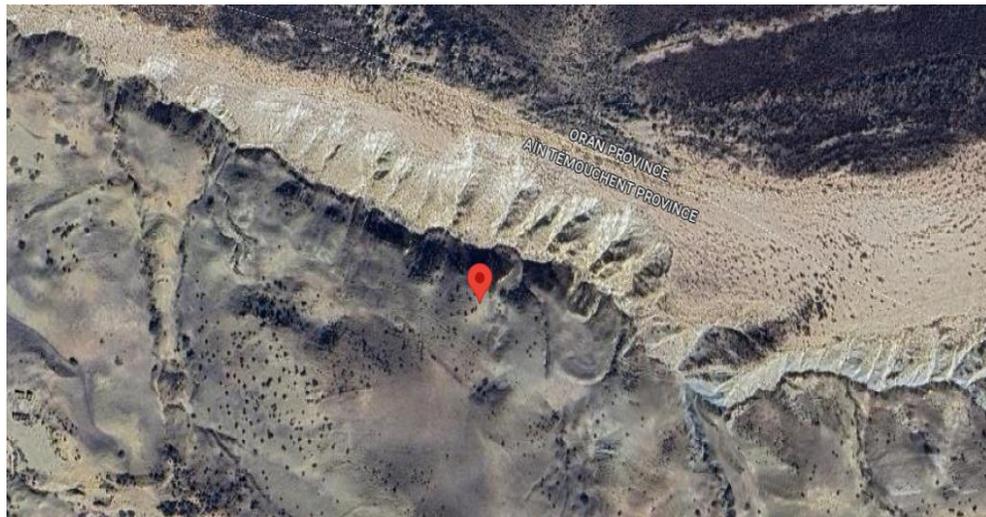


Figure 03: Oued El Melh, Tamazoura ,wilaya d'Ain Temouchent

Site N°2 :

Aïn Baida est une commune située dans la région de Hammam Bouhjer, en Algérie. Cette charmante localité est nichée au cœur d'une nature luxuriante. Aïn Baida est réputée pour ses sources d'eau naturelles, qui sont considérées comme bénéfiques pour la santé et le bien-être. Les coordonnées 35.461244, -0.953409.



Figure 04: Sebka d'Oran , Ain baida , wilaya d'Ain Temouchent

3. 3. Prélèvement des échantillons

Comme montre le tableau 02, 11 échantillons ont été prélevé à partir de deux sites géographiques différents, durant la période matinale. Ces échantillons sont répartis sur deux sites de prélèvements. La technique de prélèvement dépend de la nature de l'échantillons eau ou sol.

Eau : un volume de 100 mL a été prélevé dans des flacons stériles. Les flacons ont été trempé dans la profondeur de l'eau à 5 cm.

Sol : à l'aide d'un racleur stérile, la surface d'un 10 cm de profondeur et 15 cm de surface en été raclé, puis une quantité de 50 g ont été prélevés dans des boites stériles.

Les échantillons prélevés étaient transférés au laboratoire dans un glacier à 4°C.

Tableau 02 : Origine des échantillons étudiés dans cette étude.

Sites de prélèvement	Nature de l'échantillons	Nombre des échantillons	Quantités
Oued El Melh, Tamazoura	Sol	4	50g
	Eau	2	100 mL
Ain El baida	Sol	5	50g

3. 4. Préparation des échantillons

3. 4. 1. Enrichissement

Les échantillons recueillis ont été procédés à un enrichissement de la flore halophiles omniprésente dans un milieu nutritif salin (Annex 01) . Une quantité de 10g et un volume de 10mL respectivement de sols et de l'eau ont été déposé dans un milieu salin stérile à la raison d'un dixième. Trois enrichissements ont été réalisés pour chaque échantillons. Les cultures ont été incubées pendant une période de 4 jours à température 37°C. Cette période d'incubation permet

aux microorganismes recherchés de se développer et de se multiplier, tandis que les autres microorganismes peuvent être inhibés en raison des concentrations élevés en sel.

3. 4. 2. Isolement des microorganismes halophiles

Après l'incubation de l'enrichissement, un volume de 1mL a été ensemencé par inondation sur boîte de Petri contenu le milieu nutritif salé (NaCl : 125g ; K₂SO₄ : 0,5 ; CaCl₂ : 0,1g ; Peptone : 1g ; Amidon : 2g ; Extrait de levure : 1g ; Agar 10g). Trois boîtes de Petri était ensemencé à partir de milieu de l'enrichissement. Les cultures étaient incubées ensuite à 37°C pendant 5 jours.

3. 4. 3. Conservation des isolats obtenues

Les isolats obtenus ont été conservés sur milieu nutritive salé gélosé à 4°C.

3. 5. Caractérisation des isolats halophiles

La caractérisation des isolats halophiles consiste à réaliser plusieurs tests biochimiques : Coloration du Gram, recherche de catalase, test de l'oxydase, et les tests biochimiques.

3. 5. 1. Observation macroscopique des colonies

Les colonies obtenues sur milieu nutritif salé étaient examinées pour la morphologie des colonies. Les morphologies coloniales ont été décrites à l'aide de critères microbiologiques standards, avec un accent particulier sur la pigmentation, le diamètre, l'élévation coloniale, consistance et l'opacité.

3. 5. 2. Observation microscopique

3. 5. 2. 1. Observation à l'état frais

Cette étape était réalisée par suspension d'un ose de l'isolat dans une goutte d'eau distillée stérile sur une lame puis recouvrir par une lamelle. L'observation microscopique a été réalisée progressivement à $\times 40$ et $\times 100$. Cette technique a été utilisé pour déterminer la motilité des isolats.

3. 5. 2. 2. Coloration de Gram

La mise en évidence du type de Gram a été effectué selon la procédure décrite par Hildbrand (Hildbrand et al., 1988) (Annexe 2). L'observation microscopique était réalisée à l'objectif à 100 en présence de l'huile à immersion. Les cellules à Gram positif sont apparues au microscope optique violette, tandis que les Gram négatif rose.

L'observation microscopique a permis de déterminer également la forme des cellules.

3. 5. 3. Recherche des enzymes

3. 5. 3. 1. Catalase

Le test sert à déterminer si la bactérie possède l'enzyme catalase qui permet de réduire le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Une goutte de peroxyde d'hydrogène (3%) est déposée sur une lame à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Les isolats bactériens possédant de catalase révèle le dégagement d'oxygène.

3. 5. 3. 2. Oxydase

Ce test permet de mettre en évidence la présence de l'enzyme cytochrome C oxydase. Une ose de la colonie à tester était déposée à l'aide d'une pipette pasteur stérile sur un disque de test d(oxydase contenant 1% de Tetramethyl paraphenylene diamine dihydrochloride. Une réaction positive se traduit par le développement d'une coloration violette en moins de 10 secondes et indique la présence de l'enzyme oxydase (Kovacs., 1956).

3. 5. 3. 3. Etude de métabolismes glucidiques

Afin de déterminer le profil biochimique des isolats obtenus certains tests ont été réalisés en fonction de disponibilité de produits et réactifs.

3. 5. 3. 3. 1. Technique classique

L'étude de fermentation de certains sucres (Glucose, D-Galactose et cellulose) disponible a été réalisée selon la méthode décrite par Guiraud (1998). Elle consiste à préparer un milieu M.E.V.A.G (HUGH ET LEIFSON) contenu 1% de sucre à tester.

La fermentation des sucres était traduite par un virage de couleur due à la présence de l'indicateur coloré rouge de phenol.

D'autre test de fermentation l'aide de la galerie **API**. L'ensemencement de la galerie API 10S est illustré dans l'annexe 2.



Figure 05: Galerie API 10S

3. 5. 3. 3. 2. Recherche des enzymes

Les enzymes étudiées sont celles contenues dans les galeries API 10S disponibles dans notre laboratoire. Les enzymes étudiées sont : β -galactosidase (Ortho-NitroPhényl- β -D-Galactopyranosidase), Lysine Décarboxylase, Ornithine Décarboxylase, UREase, Tryptophane Désaminase et cytochrome-Oxydase.

3. 5. 3. 3. 3. Autres tests complémentaires

Autres tests présents ont été ainsi étudiés à savoir production de H₂S, Indole, NO₂

RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Isolement des isolats halophiles

Cette étude était portée sur deux sites de Sebkhia et Oued salé de Ain Temouchent. Comme montre le tableau 03, les résultats de l'isolement des colonies des microorganismes halophiles ont montré différents aspects culturels (formes, couleurs etc.). L'ensemble des colonies obtenues se caractérise par un aspect caractéristique des colonies bactériennes. A cet effet, l'observation des caractères culturels des colonies était synthétisée dans le tableau 03. Les caractéristiques suivantes : la taille, la forme, l'allure, le relief, l'opacité, la couleur et l'aspect ne permis pas d'identifier les isolats obtenus mais plutôt de voir seulement leurs aspects culturels.

L'étude révèle une diversité morphologique significative parmi 33 isolats bactériens, certains ayant des allures irrégulières, des colonies plates, des colonies convexes ou concaves et des apparences lisses ou rugueuses. Le diamètre des colonies varie de 1 à 8 mm et sont blanches, crème, jaunes, oranges et brunes. Certaines colonies, initialement rose orangé, disparaissent lors de la purification. La majorité des bactéries halophiles isolées de la Sebkhia Ain Témouchent ont une forme circulaire et un contour régulier, la plupart étant ponctuelles. La couleur dominante est le beige, 10 des 33 bactéries halophiles étant beiges. Sur l'ensemble des isolats étudiés 75% des isolats étaient Gram positif tandis que 25% était Gram négatif. Quant aux résultats de test de catalase, 75% des isolats sont catalase faible par rapport à l'isolat témoin de *Staphylococcus aureus*, tandis que 25% sont catalase très faible. Tenant compte les critères de la forme cellulaire, l'ensemble des isolats obtenus sont cocci.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par MENASRIA (2022) qui a réussi à isoler à partir de différents milieux extrêmes salés du Nord-Est Algérien, 74 bactéries appartenant à différents genres parmi lesquelles : *Halomonas*. Cependant, les mêmes auteurs ont isolé des *Bacillus*. Également, Khallef (2019) qui a pu isoler 7 bactéries halophiles du genre *Alkalibacillus* à partir des zones humides de Ouargla. Mais ils diffèrent de ceux obtenus par Karima (2008), qui a isolé une seule bactérie appartenant au genre *Halomonas* sur 40 bactéries halophiles, isolées de la Sebkhia d'Ezzemoul. Nos résultats ainsi que ceux trouvés par Khallef (2019) et Menasria (2022), et, nous montrent la grande diversité des bactéries qui se trouvent dans les Sebkhias (sol salins) de l'Algérie.

A la base de ces résultats, l'ensemble des isolats à Gram positif peuvent appartenir au groupe de bactéries lactique due à la catalase faible. Le groupe de bactéries lactiques renferment

plusieurs genres à savoir les *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* (Axelson, 2004). Parmi ces genres *Enterococcus* est le genre plus tolérant aux concentrations élevées en NaCl, tandis que les *Streptococcus* n'est pas tolérante (Davis et Pezzlo, 2023). Cependant les deux (7 et 8) isolats Gram négative halophiles peuvent inclure des genres comme *Vibrio*, *Salinivibrio*, *Halomonas*, *Psychrobacter*, *Photobacterium*, *Marinobacterium* and *Pseudoalteromonas* (Barada, 2012). Selon les mêmes auteurs, aucune espèce catalase négative n'est spécifiquement mentionnée.

Ces résultats biochimiques sont en différents de résultats reportés par Khellaf et al. (2018), Meklet et al. (2022), Quadri et al. (2016). Ces auteurs ont montré une biodiversité des microorganismes de différents niches écologiques.

Dans ces conditions, l'identification des isolats n'est plus possible. Elle nécessite l'exploration des outils de biologie moléculaires.

Tableau 03: Description macroscopiques et microscopiques des isolats obtenus) partir de Sabkha d'Oran et Oued el Malh.

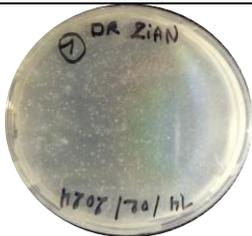
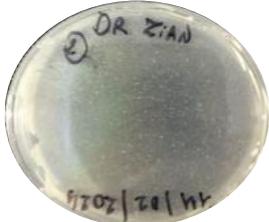
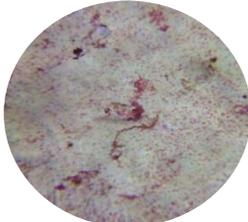
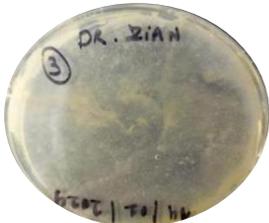
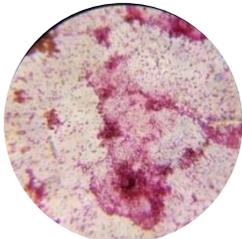
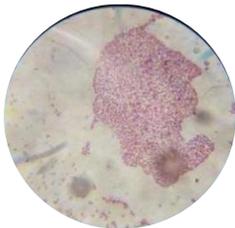
Numéro d'échantillon	Origine d'échantillon	Isolats	Description macroscopique	Observation
1	Pierre de sel (1), sebkha d'Oran		Colour blanc avec une petite taille et rond	
2	Eau salée (1), Oued Melh		Colour blanc avec une petite taille et rond	
3	Boue de sebkha, sebkha d'Oran		Ronde à irrégulière, couleur crème à jaune	
4	Pierre de sel (1), Oued Melh		Rond avec grand taille et colour blanche	

Tableau 03 : Description macroscopiques et microscopiques des isolats obtenus à partir de Sabkha d'Oran et Oued el Malh (Suite 1).

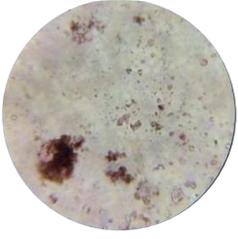
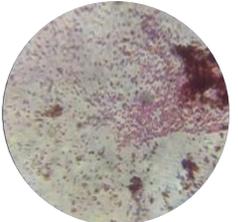
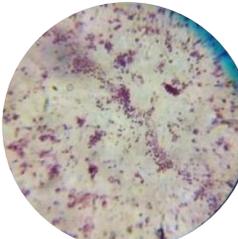
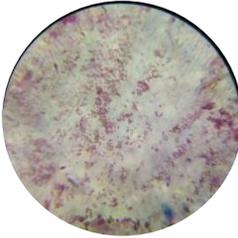
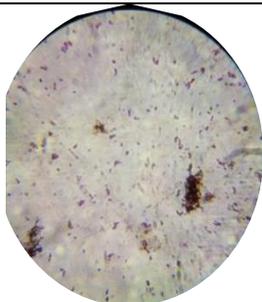
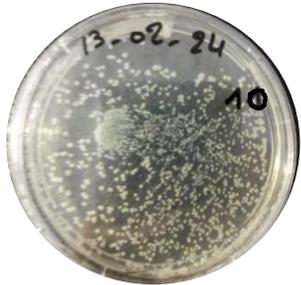
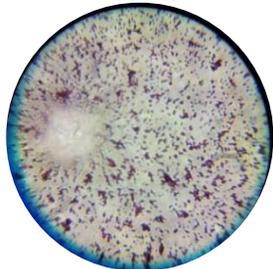
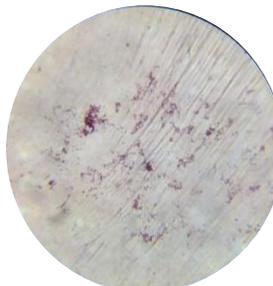
Numéro d'échantillon	Origine d'échantillon	Isolats	Description macroscopique	Observation
5	Eau salée (2) ,Oued Melh		Colour blanche fluorescent et diffusé dans le milieu	
6	Sol salée de sebkha (1), sebkha d'Oran		Rond avec une petite taille couleur crème à jaune	
7	Sol salée de sebkha (2), sebkha d'oran		Rond avec petite taille et couleur blanche	
8	Sol salée de sebkha (3), sebkha d'Oran		Couleur blanche fluorescent et diffusé dans le milieu	

Tableau 03 : Description macroscopiques et microscopiques des isolats obtenus à partir de Sabkha d'Oran et Oued el Malh (Suite 1).

Numéro d'échantillon	Origine d'échantillon	Isolats	Description macroscopique	Observation
9	Pierre de sel (2), sebkha d'oran		Couleur blanche fluorescent et diffusé dans le milieu	
10	Boue de ruisseau, Oued Melh		Couleur crème à jaune Rond avec une grand taille	
11	Pierre de sel (2), Oued Melh		Couleur crème à jaune Rond avec une grand taille	

4.2. Dénombrement des colonies des isolats halophiles

Comme montre le Tableau 04, les résultats de la recherche de microorganismes halophile après enrichissement montraient que l'ensemble des échantillons renferment des bactéries halotolérant avec des concentrations élevés révélé par des boites trop chargées.

Tableau 04 : Niveau de contamination des échantillons analysés.

		Nombre des échantillons	Prévalence	Moyenne
Sabkha de ain baida	Sol	4	100	Ind
	Eau	2		
Oued El Malh	Sol	5		

Tableau 05 : Distribution des genres identifiés dans les échantillons analysés.

Origine	Isolat	Catalase	Type de Gram	Forme	Mobilité	Genre
Oued el malh						
Sol	1	Faible	+	Cocci	-	Groupe bactéries lactique
	3	Faible	-		-	
	6	Très faible	+		-	
	9	Faible	+		-	
Sabkha de Ain Baida	5	Faible	+		-	
	2	Faible	-		-	
	4	Faible	+		-	
	10	Faible	+		-	

11	Faible	+	-	
7	Très faible	+	-	Gram négative
8	Faible	+	-	halophiles peuvent inclure des genres comme <i>Vibrio</i> , <i>Salinivibrio</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Photobacterium</i> , <i>Marinobacterium</i> and <i>Pseudoalteromonas</i>

4.3. Tests biochimiques

Les résultats des tests biochimiques en utilisant la galerie classique sont reportés dans le tableau 06 et la figure 18.

Les résultats de la galerie API 10S réalisée sur les bactéries halophiles isolées de la Sebka de Ain BAIDA sont mentionnés dans le tableau 06 et la figure 19. Ces résultats montrent que l'ensemble des isolats sont oxydases négative.

D'après les résultats de l'API 10S, seules les souches 2 et 5 sont incapable capables d'utiliser le glucose et D-Galactose respectivement. Cependant l'ensemble des isolats ont pu fermenter la cellulose. Par ailleurs, les autres tests ont reconnu une variabilité de réponse du probablement à la souche eux-mêmes, et de la qualité de tests.

Les résultats ont montré une capacité de production des enzymes impliquées dans l'utilisation des celluloses. Ce résultat montre la possibilité d'utiliser ces souches à des fins technologiques

Tableau 06 : Résultats des tests biochimiques de la galerie API 10S des isolats bactériens halophiles isolées de la Sebka de Ain Baida et Oued el Malh.

Isolat	Forme	Gram	Catalase	Oxydase	Galerie 10S										
					ONPG	GLU	ARA	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	GLU
1	cocci	Positive	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2	cocci	Négative	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	cocci	Négative	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
4	cocci	Positive	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5	cocci	Positive	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
6	cocci	Positive	+ -	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7	cocci	Positive	+ -	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
8	cocci	Positive	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
9	cocci	Positive	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
10	cocci	Positive	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
11	cocci	Positive	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+

CONCLUSION

Conclusion

l'ensemble des échantillons analysés renferment des bactéries halo-tolérant . L'identification de ces bactéries s'était avérée difficile à déterminer à cause de leur caractéristique physiologique et biochimique spécifiques. Cette étude s'était contentée de déterminer seulement le groupe de ces micro-organismes. 75% des isolats appartiennent au groupe de Bactéries lactiques et 25% des autres isolats appartiennent au deuxièmes groupes. Ces deux groupes sont très hétérogènes et demande des tests biochimiques complémentaires.

Les résultats de cette étude ont montré une diversité phénotypique et biochimique. Les études des attaques des glucides ont montré que ces bactéries présentent un potentiel producteur des enzymes à savoir la cellulose. A cet effet, ces isolats peuvent être utilisé à des fins technologiques.

Au terme de ce travail, l'identification moléculaires de ces isolats est primordiale avec des études approfondies des caractères technologiques comme la production des enzymes, antimicrobienne...etc.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIE

- **Ventosa A, de la Haba R R, Sánchez-Porro C, Papke R T** 2015. Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. *Current Opinion in Microbiology*. 25, 80-87.
- **Oren, A.** 2010, July .Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms.*EnvironmentalTechnology*,31(8–9),825–834.
- **Kumar Tiwary, B., & Alam, M.** 2023, January 16. Extremophiles: An Overview. Extremophiles: Diversity, Adaptation and Applications,1–23.
- **Barbafieri, M., Bretzel, F., Scartazza, A., Di Baccio, D., Rosellini, I., Grifoni, M., Pini, R., Clementi, A., & Franchi, E.** 2023, April 22. Response to Hypersalinity of Four Halophytes Growing in Hydroponic Floating Systems: Prospects in the Phytomanagement of High Saline Wastewaters and Extreme Environments. *Plants*, 12(9).
- **Vera-Gargallo, B., Hernández, M., Dumont, M. G., & Ventosa, A.** 2023, April 20. Correction: Thrive or survive: prokaryotic life in hypersaline soils. *Environmental Microbiome*, 18(1)
- **Sánchez-Porro, C.** 2023, March 8. Special Issue “Halophilic Microorganisms.” *Microorganisms*, 11(3)
- **Elevi Bardavid, R., Khristo, P., & Oren, A.** 2006, December 21. Interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles*, 12(1), 5–14.

- **Toffin, L, L'Haridon, S., Haroun, H., Corre, E., Roussel, E., Chalopin, M., Pignet, P., Balière, C., la Cono, V., Jebbar, M., Yakimov, M.,** 2020, September. Methanohalophilus profundus sp. nov., a methylotrophic halophilic piezophilic methanogen isolated from a deep hypersaline anoxic basin. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(5),
- **Cadeau, P., Jézéquel, D., Groleau, A., Di Muro, A., & Ader, M.** 2023, January 17. Impact of the seismo-volcanic crisis offshore Mayotte on the Dziani Dzaha Lake. *Comptes Rendus. Géoscience*, 354(S2), 299–316.
- **Oren A.**, 2002. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology and application. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*
- **Omar Saeed Baghabra Al-Amoudi, Sahel N. Abduljawwad , Zaghloul R. El-Naggar, Rasheeduzzafar.** Décembre 1992. Réponse de sabkha aux tests de laboratoire : une étude de cas
- **HAFHOUF ,I.** 2022. Étude de l'endommagement des sols salés soumis à des sollicitations d'humidification Séchage (température- humidité).
- **Perthuisot, J. P.** 1976. Une Sebkhia sulfatée sodique en pays sédimentaire. La Sebkhia Oum el Krialate (Sud tunisien). *Géologie Méditerranéenne/Géologie Méditerranéenne*, 3(4), 265–274.
- **Vera-Gargallo, B., Navarro-Sampedro, L., Carballo, M., & Ventosa, A.** 2018. Metagenome Sequencing of Prokaryotic Microbiota from Two Hypersaline Soils of the Odiel Salt Marshes in Huelva, Southwestern Spain. *Genome Announcements*, 6(9).
- **Dam, B., Pal, S., Sar, A., & Mukherjee, P.** 2023. Halophilic Microorganisms: Diversity, Adaptation and Application. In BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS eBooks pp. 146–181
- **Ventosa, A., Márquez, M. C., Garabito, M. J., & Arahál, D. R.** 1998. Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles*, 2(3), 297–304.

- **Andrei, A. T., Banciu, H. L., & Oren, A.** 2012. Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiology Letters*, 330(1), 1–9.
- **Oren, A., Arahall, D. R., & Ventosa, A.** 2009. Emended descriptions of genera of the family Halobacteriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(3), 637–642.
- **Waditee-Sirisattha, R., Kageyama, H., Tanaka, Y., Fukaya, M., & Takabe, T.** 2016. Overexpression of halophilic serine hydroxymethyltransferase in fresh water cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942 results in increased enzyme activities of serine biosynthetic pathways and enhanced salinity tolerance. *Archives of Microbiology*, 199(1), 29–35.
- **Baker, S. A., & Rutter, J.** 2023. Metabolites as signalling molecules. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 24(5), 355–374.
- **Zhang, M., Du, H., Ji, J., Li, F., Lin, Y. C., Qin, C., Zhang, Z., & Shen, Y.** 2021. Highly Efficient Ag₃PO₄/g-C₃N₄ Z-Scheme Photocatalyst for Its Enhanced Photocatalytic Performance in Degradation of Rhodamine B and Phenol. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 26(7), 2062.
- **Amani, Y. F. C., M'bo, K. a. A., Cherif, M., Koné, D., & Kouamé, C.** 2023. Diversité des Champignons Mycorhiziens à Arbuscule Associés aux Cacaoyers (*Theobroma cacao* L.) en Côte d'Ivoire. *European Scientific Journal*, 19(27), 179.
- **Zhou, N., Zhang, Y., Liu, F., & Cai, L.** 2016. Halophilic and thermotolerant *Gymnoascus* species from several special environments, China. *Mycologia*, 108(1), 179–191.
- **Anthones, S., & Vargas-Muñiz, J. M.** 2022. *Hortaea werneckii* isolates exhibit different pathogenic potential in the invertebrate infection model *Galleria mellonella*. *Frontiers in Fungal Biology*, 3.

- **Śliżewska, W., Struszczyk-Świta, K., & Marchut-Mikołajczyk, O.** 2022. Metabolic Potential of Halophilic Filamentous Fungi—Current Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4189.
- **Diallo, B., Samba, S., & Sane, D.** 2023. Effets de champignons MA sur la croissance et le développement de plants de ricin élevés sous contrainte saline en conditions semi-contrôlées. *Revue Des Énergies Renouvelables*, 19(1).
- **Laraib, F., Rauf, R., Dilshad, R., Jameel, N., & Batool, R.** 2022. Characterization of Halophilic Bacteria Isolated from Khewra Salt Mines. *LGU Journal of Life Sciences*, 6(02), 133–147.
- **Medjekal, S., Ghadbane, M., Belhadj, H., & Benderradji, L.** 2023. Production and characterization of crude proteases from *Halobacillus salinus* strain DZ28 newly isolated from salt lake sediments in Algeria and their use as detergent bio additives. *International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences*, 7(1), 88–100.
- **Han, H. L., Danganan, R. E., Li, Z., Shin, N. R., Bennett, R. M., Dedeles, G. R., & Kim, S. G.** 2022. *Halorubrum salinarum* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a saturated brine pond of a saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(1).
- **Obruča, S., Dvořák, P., Sedláček, P., Koller, M., Sedlář, K., Pernicová, I., & Šafránek, D.** 2022. Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: towards sustainable production of microbial bioplastics. *Biotechnology Advances*, 58, 107906.
- **Bagchi, S. K., Patnaik, R., Sharma, N., & Prasad, R.** 2023. Extremophilic Microalgae. In *CRC Press eBooks* (pp. 151–166). h
- **Ishika, T., Moheimani, N. R., Bahri, P. A., Laird, D. W., Blair, S., & Parlevliet, D.** 2017. Halo-adapted microalgae for fucoxanthin production: Effect of incremental increase in salinity. *Algal Research*, 28, 66–73.

- **Fleurence, J.** 2023. Les microalgues et les cyanobactéries en nutrition humaine : des pratiques ancestrales aux applications actuelles. *Pratiques En Nutrition*, 19(76), 12–15.
- **Barbosa, M., Inácio, L. G., Afonso, C., & Maranhão, P.** 2023. The microalga *Dunaliella* and its applications: a review. *Applied Phycology*, 4(1), 99–120.
- **Koru, E.** 2012. Earth Food *Spirulina* (*Arthrospira*): Production and Quality Standarts. In *InTech eBooks*.
- **Esakkimuthu, S., Wang, S., & Abomohra, A.** 2023. Catalyst in Action. In *Springer eBooks* (pp. 321–355)
- **Ramasamy, S., Pakshirajan, K., Murugan, D., & Saini, G. K.** 2023. Lutein Production by Halophilic Microalgae Using Anaerobic Digestate as the Substrate and Its Potential Application as a Biopesticide. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- **Menasria, T., Monteoliva-Sánchez, M., Benhadj, M., Benammar, L., Boukoucha, M., & Aguilera, M.** 2022. Unraveling the enzymatic and antibacterial potential of rare halophilic actinomycetes from Algerian hypersaline wetland ecosystems. *Journal of Basic Microbiology*, 62(10).
- **Kharroub, K., Lizama, C., Aguilera, M., Boulahrouf, A., Campos, V., Ramos-Cormenzana, A., & Monteoliva-Sanchez, M.** 2008. *Halomicrobium katesii* sp. nov., an extremely halophilic archaeon. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(10).
- **Khallef, S.** 2019. Etude de la flore bactérienne halophile cultivable des zones humides de ourgla (algérie) .

ANNEXES

Annex 01

Méthode de preparation de milieu de culture pour isoler les micro-organismes halophiles :

la souche :

pour isoler les souches halophiles par utiliser la méthodologie proposer par sahli et al. (2020) , avec modification par utiliser la culture enrichissement avec techniques de lavage des surfaces .

Nos utilisons ECM (enriched culture medium) composé de

- 5 g/l de peptone,
- 1g L⁻¹ de extrait de levure ,
- 200g L⁻¹ NaCL
- 30 g de MgCl₂ 6H₂O
- 30 g de MgSO₄ 7H₂O
- 0,5 g CaCl₂ 2H₂O
- 7 g KCl

Le ph est ajuster sur 7.2 , le milieu solide a été ajouté avec 17gL⁻¹ agar

Les isolat sont ont été cultivées dans un milieu standard contenant (par litre)

Annex 02

Méthode de coloration de Gram :

Mode opératoire :

Réactif :

le violet phénique : violet de gentiane (Crystal de violet) + alcool absolu + eau phéniquée- liquide de Lugol : iode + iodure de potassium + eau distillée- alcool 96° (agent de décoloration)- solution de fuschine ou de safranine (colorant de contraste) solution de fuschine saturée a l'alcool+eau distillée

Matériels :

Microscope optique, lame, bec de bunsen, pipette pasteur, anse de platine, huile de cèdre, ainsi que le matériel habituel du laboratoire de Microbiologie.

Réalisation de la coloration :

1. Coloration primaire : Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Rincer à l'eau déminéralisée.
2. Mordançage au lugol (solution d'iodo-iodurée): étaler le lugol et laisser agir 60 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée. On peut réaliser une deuxième fois l'opération identiquement pour plus de sécurité.
3. Décoloration (rapide) à l'alcool (+acétone): verser goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée.

4. Contre-coloration à la safranine ou à la fuchsine. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes

Annex 03

Méthode de Etude de métabolismes glucidiques (technique classique) :

PRINCIPE

La bandelette API 10 S est constituée de 10 microtubes contenant substrats déshydratés. Ces tests sont inoculés avec un suspension bactérienne qui constitue le milieu.

Pendant l'incubation, le métabolisme produit des changements de couleur qui sont soit spontanées, soit révélées par l'addition de réactifs.

Les réactions sont lues selon le Tableau de lecture et l'identification s'obtient en consultant la liste des profils dans cette notice ou en utilisant l'identification logiciel.

PRESENTATION (Coffret de 50 tests)

- 50 galeries API 10 S
- 50 boîtes d'incubation
- 50 fiches de résultats
- 1 barrette de fermeture
- 1 notice

COMPOSITION DE LA GALERIE

La composition de la galerie API 10 S est reportée dans le Tableau de Lecture de cette notice.

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Réactifs :

- API NaCl 0,85 % Medium, 5 ml (Réf. 20 230) ou

API Suspension Medium, 5 ml (Réf. 20 150)

- Réactifs : TDA (Réf. 70 402)

JAMES (Réf. 70 542)

NIT 1 + NIT 2 (Réf. 70 442)

- Oxydase (Réf. 55 635*)

Matériel :

- Pipettes ou PSIpettes

- Protège-ampoule

- Portoir pour ampoules

- Équipement général de laboratoire de bactériologie

