

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Populaire et Démocratique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي بومرداس

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد بوقرة بومرداس

Université M'hamed Bougara de Boumerdès



Faculté des Sciences
Département de
Biologie

Mémoire de fin
d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Spécialité : Biologie

Filière : Biotechnologie microbienne

**Thème : Isolement et identification des bactéries de genre
Bacillus isolées à partir des sols halophiles (Sebkha)**

Présenté par :

BOUGRINAT Khalissa

ZIANI Khadoudja

Le jury composé de :

Présidente : Dr MOHAND KACI H. Professeur UMBB

Examinatrice : Dr AITKAKI A. MCA UMBB

Promotrice: Dr BENZINA. F. MCA UMBB

Co-promotrice: BERKAT A. Doctorante UMBB

Année universitaire : 2022/2023

Remerciements

Nous tenons à exprimer dans un premier temps nos vives gratitude et notre profonde reconnaissance à notre promotrice **Dr BENZINA Farida**, pour ses précieuses aide et les conseils que nous avons trouvé auprès d'elle, et également pour les discussions enrichissantes que nous avons tenues ensemble.

Nous remercions notre co-promotrice **Madame BERKAT Amina**, de nous avoir fait confiance tout au long de ce travail et pour ses encouragements, notamment durant la partie pratique. Merci pour votre gentillesse, votre patience, de votre générosité et de votre disponibilité. Nous sommes eues vraiment un grand honneur de travailler sous votre codirection.

Nous remercions les membres du jury **Madame MOHAND KACI H. et Madame AIT KAKI A.** qui nous ont fait l'honneur de bien vouloir juger et évaluer notre travail.

Nos remerciements vont également à tous les enseignants de notre faculté qui nous ont suivi et formé tout le long de notre cursus universitaire, et à toute l'équipe pédagogique responsable de notre formation.

Enfin, nous tenons à remercier nos très chers parents, qui ont été toujours là pour nous, ainsi que nos proches et amis pour leurs soutiens et leurs encouragements

Dédicace

A l'aide du tout puissant 'Allah', le Clément, le Miséricordieux, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

*A ceux que personne ne peut compenser les sacrifices pour mon éducation et mon bien être, ceux qui m'ont accordée leur soutien, amour et bénédiction dans les instants les plus difficiles de mon existence, mes parents **Ziani Ali et Oussalem Nora** qui me sont les plus chers au monde. Qu'Allah me les garde. Vos prières et vos conseils ne m'ont jamais fait défaut tout au long de mes études. Je voudrais à travers ce modeste travail, vous rendre un hommage mérité et vous dire combien je suis fière de l'éducation que vous m'avez donnée. Puisse le Tout Puissant nous accorder de vous avoir encore longtemps auprès de nous pour que vous puissiez bénéficier de l'ombre de l'arbre que vous avez si jalousement protégé et entretenu.*

À mes frères et mes sœurs, A mes nièces et mes neveux À tous mes proches, À tous mes amis, A tous ce que j'aime beaucoup.

Khadoudja

Dédicace

*Je tiens avant toute chose, à remercier le bon **Dieu** qui m'a donné la force, le courage et la santé pour pouvoir mener à terme ce modeste travail et poursuivre mes études avec succès.*

À Ma mère, qui a prié toujours pour moi, elle a sacrifié jusqu'au bout et ma encouragé à réaliser mes rêves. Merci ma mère de m'avoir donné un bon pied dans la vie.

À Mon père, qui était toujours présent d'arrière moi par son soutien et ces encouragements, Je t'offre tout mon respect et mon amour. Que Dieu te garde pour moi.

*À ma sœur « **Ibtihal** », pour leur gentillesse et leur soutien, que votre chemin soit plein de succès.*

À mes tantes pour leurs précieux conseils.

*À mon cher « **Adem** » en témoignage de tout mon respect et amour. J'ai toujours trouvé auprès de toi la compréhension et le soutien.*

Que dieu te protège.

À tous mes amis et à toutes les personnes que j'ai rencontré et qui ont impacté positivement ma vie.

Khalissa

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
I.1. Le monde des extrêmophiles.....	3
I.1.1 Diversité de monde extrêmophiles.....	3
I.1.1.1. Les milieux alcalins.....	4
I.1.1.2. Les milieux acides.....	5
I.1.1.3. Les milieux psychrophiles.....	5
I.1.1.4. Les milieux thermophiles et hyper thermophiles	5
I.1.1.5. Les milieux Piézophiles (barophiles)	6
I.1.1.6. Les milieux halophiles.....	6
I.2. Les sols salins	7
I.2.1. Les sols salins	9
I.2.2. La salinisation des sols	9
I.2.3. Sebkha.....	10
I.2.4. Origine et genèse des sels	10
I.2.5. Répartition géographique des sols salés dans le monde et dans l'Algérie.....	11
I.2.6. Répartition de Sebkha en Algérie	11
I.2.7. Influence des sels sur les communautés microbiennes des sols.....	12
I.3. Diversité des microorganismes halophiles.....	13
I.3.1. Diversité phylogénétique des halophiles	13
I.3.1.1. Eucaryotes halophiles	14
I.3.1.2. <i>Archaea</i> halophiles.....	14
I.3.1.3. Bactéries halophiles	14
I.3.2. Définition des bactéries halophiles.....	15
I.3.3. Habitat des bactéries halophiles	15
I.3.4. Classification des bactéries halophiles	16
I.3.5. Méthodes d'adaptation des bactéries halophiles	17
I.3.5.1. Adaptation à la salinité par la production d'osmoprotecteurs.....	17
I.3.5.2. Adaptation à la salinité par accumulation de KCl	18
I.3.6. Diversité métabolique de microorganismes halophiles et halotolérants	18
I.4. Le genre <i>Bacillus</i>	18
I.4.1. Définition.....	20
I.4.2. Taxonomie.....	20
I.4.3. La classification.....	20
I.4.4. Caractères bactériologiques.....	21
I.4.5. Les caractères physiologiques	21

I.4.6. Habitat.....	22
I.4.7. Le pouvoir pathogène.....	22
I.4.8. Les Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)	23
II.1. Présentation de la région d'étude.....	28
II.1.1. Situation géographique.....	28
II.1.2 Facteurs écologiques.....	29
II.1.2.1. Le sol	29
II.1.2.2. Le relief.....	29
II.2. Matériel utilisé.....	29
II.2.1. Matériel non biologique	29
II.2.2. Matériel biologique.....	29
II.3. Méthodes.....	29
II.3.1. Echantillonnage.....	29
II.3.2. Isolement de souches bactériennes.....	30
II.3.2.1. Préparation des dilutions	30
II.3.2.2. Etallement	30
II.3.2.3. Purification.....	30
II.3.3. Identification présomptive des bactéries isolées.....	30
II.3.3.1. Observation microscopique.....	31
II.3.3.2. Etudes des enzymes respiratoires.....	32
II.3.4. Mise en évidence des activités enzymatiques extracellulaires.....	33
II.3.5. Etude des paramètres physiologiques	35
III.1. Isolement et caractérisation des souches isolées	37
III.1.1. Caractérisation macroscopique	37
III.1.2. Caractérisation microscopique.....	38
III.1.3. Résultats des tests d'enzymes respiratoires ; catalase et oxydase.....	38
III.2. Résultats des tests enzymatiques	40
III.3. Résultats des tests physiologiques	51

Conclusion

Résumé

Annexe

Liste des figures

Figure 1: Vue d'ensemble des dépôts hydrothermaux de sels chargés en métaux à Dallol (Afar, Éthiopie) et riches en microorganismes.....	6
Figure 2 : Exemples d'environnements hypersalins athalassohalins.....	7
Figure 3 : Les marais salants de Gruissan (Aude) et leur couleur rose caractéristique à certaines saisons	8
Figure 4 : Arbre phylogénétique universel basé sur le séquençage du gène d'ARNr (16S)	13
Figure 5 : Différents groupes de microorganismes halophiles.....	17
Figure 6 : Caractéristiques morphologiques des Bacillus (A: Cellules végétatives, B: Spores).....	21
Figure 7 : Situation géographique de la région Bordj Omar Driss	29
Figure 8 : La Sebkhha de Bordj Omar Driss : a- site de prélèvement b : sol prélevé.....	30
Figure 9 : les étapes de la recherche de la catalase	32
Figure 10 : les étapes de la recherche de l'oxydase	32
Figure 11: Recherche de production de NH_3	33
Figure 12 : Aspects macroscopiques des souches bactériennes isolées sur milieu solide gélose nutritif après 24h d'incubation	37
Figure 13 : Observation microscopique des souches cultivée sur milieu GN après coloration de Gram (Observation par microscope optique G x100 à immersion). Les flèches montrent les cellules bactériennes sporulées.....	38

Figure 14 : Résultats positifs (A, B) de la recherche des enzymes respiratoires.....	39
Figure 15 : Résultat de la culture des souches (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S9, S10, S11) sur le milieu Mannitol-mobilité après 24 heures d'incubation à 37°C	39
Figure 16 : Résultats de la recherche de l'activité amylasique des souches bactériennes isolées sur le milieu amylase après 48 heures d'incubation à 37°C. A : dégradation totale de l'amidon ; B : dégradation partielle ; C : Témoin (pas de dégradation)	41
Figure 17 : Résultats de la recherche de l'activité de pectinolytique des souches bactériennes sélectionnées sur le milieu pectine après 48 heures d'incubation à 37°C. A : activité importante observée chez la souche S4 ; B : une faible activité observé chez la souche S9 ; C : Aucune activité observée.....	42
Figure 18 : Résultats de la recherche de l'activité de pectinolytique des souches bactériennes sélectionnées sur le milieu pectine après 48 heures d'incubation à 37°C. A : activité importante observée chez la souche S4 ; B : une faible activité observé chez la souche S9 ; C : Aucune activité observée.....	44
Figure 19 : Résultats de la recherche de l'activité lipasique des souches (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S9, S10, S11) sur le milieu tween 80 après 48 heures d'incubation à 37°C. Les flèches montrent le halo opaque autour des colonies	45
Figure 20 : Résultats de la recherche de l'activité lipasique sur le milieu à base de Tween 20 des souches (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S9, S10, S11) après 48 heures d'incubation à 37°C. Les flèches montrent le halo opaque autour des colonies et le point de dépôt des sels	46
Figure 21 : Résultats de la recherche de l'activité protéasique des souches (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S9, S10, s11) sur la protéase après 48 heures d'incubation à 37°C	47
Figure 22 : Résultats de la recherche de l'activité glucanase des souches bactériennes isolées (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S9, S10, S11) sur le milieu glucane après 48 heures d'incubation à 37°C. Les flèches montrent les zones d'hydrolyse.....	48
Figure 23 : Résultat de production de l'ammoniac par les souches bactériennes testées après 48 heures d'incubation	49

Figure 24 : Résultats de la recherche de l'activité du AFM des souches (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S9, S10, S11) sur le milieu AFM après 48 heures d'incubation à 37°C	50
Figure 25 : Effet de la température sur la croissance bactérienne des neuf souches bactériennes isolées	54
Figure 26 : Effet de la variation du pH sur la croissance des souches bactériennes testées.....	55

Liste des tableaux

Numéros de tableau	Titre	Page
1	Microorganismes extrêmophiles et leurs environnements	3
2	Superficie affectée par la salinité dans le monde	11
3	Classification de microorganismes halophiles basée sur la tolérance au sel	17
4	les résultats des tests physiologiques et biochimiques effectués.	40
5	Résultats des différentes activités enzymatiques testés sur les souches bactériennes isolées à partir de la Sabkha de Bordj Omar Idris	51
6	Résultats de la croissance des souches bactériennes testées après 24 h d'incubation aux différentes températures	53
7	La densité optique des souches bactériennes testées après incubation à 48 h dans l'incubateur agitateur	56

Liste des abréviations

PH : Potentiel Hydrogène.

MPa : Mégapascal

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène

CMC: carboxyméthylcellulose

DO: densité optique

NaCL: Chlorure de Sodium.

AFM: Azot Free Medium.

(NH₄)₂HPO₄ : Phosphate de

diammonium.Mg SO₄: Sulfate de

magnésium.

MgSO₄ 7H₂O: Magnesium sulfate

heptahydrate.K₂HPO₄: Phosphate dipotasique.

KCL: Chlorure de potassium.

FeSO₄ : Sulfate ferreux.

MnSO₄ : Sulfate de

manganèse.ZnSO₄ : Sulfate de

zinc.

NaNO₃ : Nitrate de sodium.

CaCl₂ 2H₂O : Chlorure de Calcium

Dihydrat.GN : Gélose Nutritive.

Dans la nature, les micro-organismes sont abondants dans différents types d'habitats en raison de leurs spécificités, de leurs propriétés uniques et de leurs grandes diversités métaboliques. On les trouve dans les océans, l'air, le sol etc....

Jusqu'au XXe siècle, on pensait que la vie n'existait que dans des environnements "normaux", c'est-à-dire dans des conditions compatibles avec la vie humaine. Les chercheurs ont commencé à rechercher des organismes capables de survivre dans des environnements extrêmes loin de ces critères **(Peduzzi et al, 2006)**, et vraiment leurs tentatives et leurs recherches ne se sont pas soldées par un échec, ils ont découverts les « extrêmophiles ». Ces derniers on les trouve dans une variété de conditions environnementales (couvrant une large gamme de pH, de température, de salinité, de métaux lourds, l'activité de l'eau etc...). Il existe des extrêmophiles qui prospèrent dans des biotopes combinant plusieurs conditions physicochimiques extrêmes, ils sont donc qualifiés de polyextrêmophiles ou pluri_extremophiles **(Michel et al, 2018)** (par exemple ceux qui vivent dans des hautes températures et une concentration élevée en sels). Ces microorganismes appartiennent aux trois domaines de la vie : Eukaryota, Bacteria et Archaea **(Kirtel et al, 2018 ; Verma et al, 2020)**.

Les premiers organismes extrêmophiles connus étaient les halophiles, qui ont été trouvés dans des environnements que beaucoup croyaient être sans vie **(Michel et al, 2018)**. Un environnement est qualifié hyper salin quand la concentration en sels est supérieure à celle de l'eau de mer, qui est d'environ 35g/l **(DasSarma et DasSarma, 2017)**. La plupart de ces plans d'eau sont composés d'énormes lacs salés continentaux qui sont généralement limités aux régions arides à semi-arides ; comme le Grand Salt Lake dans l'Utah (USA), la Mer Morte, et les marais salants de diverses nations comme le Lac Rose .au Sénégal. Et les lacs s'étendent de la côte nord de l'Algérie jusqu'au Sahara à travers les Hauts Plateaux et sont formés par d'immenses dépressions endoréiques continentales connues sous le nom de Chotts et Sebkhas **(Menasria et al, 2018)**.

De nombreuses études ont été menées sur les sols halophiles pour identifier des espèces spécifiques d'halophiles, telles que les bactéries du bacille qui ont un potentiel biotechnologique important. Les bactéries du genre *Bacillus* sont un exemple d'espèces prometteuses dans domaines d'intérêt biotechnologique et agricole. Cela est dû à leur taux de croissance rapide et à la sécrétion extracellulaire de nombreuses biomolécules tels que les enzymes, les phytohormones, des antibiotiques et des bio surfactants **(Schallmey et al, 2004)**.

Les espèces du genre *Bacillus* possède également des capacités physiologiques extraordinaires qui lui permettent de survivre dans un large éventail d'environnements extrêmes. Il peut être halophile, acidophile, alcaloïde, halotolérant ou thermophile (**Awais et al, 2007**).

Notre étude s'inscrit dans cette optique et le principal objectif de ce travail était basé sur l'isolement, l'identification, le screening des activités enzymatiques et la caractérisation physico-chimique des bactéries halotolérantes isolées à partir d'un milieu hyper salin qui est la sebkha saharienne (Bordj Omar Idriss).

La première partie de ce travail est consacrée à la description des données bibliographiques relatives aux environnements hyper salins et aux bactéries halotolérantes et halophiles du genre *Bacillus* ainsi que les intérêts biotechnologiques.

Cependant une deuxième partie, représente le travail pratique et qui indique la méthodologie adaptée pour la réalisation de ce travail.

Ainsi que l'exposition et la discussion des résultats obtenus.

La dernière partie est une conclusion générale et quelques perspectives qui sont en relation directe avec le travail réalisé.

I.1. Le monde des extrémophiles

Le terme "extrémophiles" a été inventé pour la première fois en **1974 par Mac Elroy** dans un article intitulé "Some Comments on the Evolution of Extremophiles" dans la revue Biological Sciences, et il a été interprété de plusieurs manières comme des micro-organismes ultimement apparentés qui habitent des niches écologiques extrêmes caractérisées par des conditions défavorables au développement de la vie. Ces conditions peuvent être allées du froid extrême avec des températures basses (psychrophiles) à des hautes températures qui peuvent atteindre jusqu'à 121°C (Hyper thermophiles), elles peuvent être caractérisées aussi par un pH très acides (acidophiles) ou très alcalin (alcalophiles), de haute salinité (halophiles), des pressions barométriques de plusieurs tonnes (barophiles) **(Daoud et Ben Ali, 2020)**.

Les extrémophiles peuvent vivre dans les déserts où il y a manque d'eau, les eaux ou les sols à forte salinité, les cheminées hydrothermales volcaniques ou sous-marines, ...etc., et ont une capacité enzymatique et une stabilité bien supérieures dans des conditions extrêmes. Ces enzymes sont appelées extrêmeoenzymes et ont été largement utilisées en biotechnologie comme dans la transformation des aliments, la bioremédiation et dans les processus de biosynthèse **(Antoine, 2022)**.

I.1.1 . Diversité de monde extrémophiles

Dans la dernière décennie, le développement de nouveaux outils qui permettent d'analyser directement l'ADN issu de communauté microbienne (le méta génomique) à bouleverser notre vision des écosystèmes microbiens. Grâce à eux, on a découvert des environnements longtemps considérés comme incompatibles avec la vie. Malgré leurs conditions physiques et chimiques extrêmes, il contient des formes de vies microbiennes abondantes **(Cowan et al, 2015)**.

Le tableau ci-dessous montre une variété de microorganismes extrêmes et leurs environnements.

Tableau 1 : Microorganismes extrêmophiles et leurs environnements (Adapté de **Horikoshi and Bull (2011)**).

Microorganismes extrêmophiles	Environnement favorable à la croissance
Acidophile	pH optimum de croissance < 3
Alcalophile	pH optimum de croissance > 10
Halophile	Nécessite au moins 1M de sel pour la croissance
Hyper thermophile	Croissance optimale à des températures > 80 °C
Thermophile	Croissance à des températures entre 60 °C et 85 °C
Eurypsychrophile (psychrotolérant)	Croissance à des températures > 25 °C, mais également < 15 °C
Stenopsychrophile (psychrophile)	Croissance à des températures entre 10 °C et 20 °C
Piézophile	Croissance sous haute pression —> 400 atm (40 MPa)

I.1.1.1. Les milieux alcalins

L'environnement alcalin est l'endroit où les micro-organismes alcalinophiles prospèrent. Ces organismes poussent le mieux dans des conditions alcalines et fonctionnent de manière optimale de pH supérieurs à 9,0, souvent autour de 10,0, tout en montrant une croissance qui est peu ou pas à des niveaux affectés par les valeurs de pH neutre (**Jane A. Irwin et al., en 2004 (Horikoshi ,1999)**). A un pH de 10,5, une variété de micro-organismes peuvent se développer (**Martins et al. 2001**). Les alcalophiles, également connus sous le nom de haloalcalophiles, sont souvent isolés des environnements naturels qui ont tendance à avoir des concentrations élevées de chlorure de sodium. (Na Cl) (**Gareeb et Setati, 2009**).

Les bactéries alcaliques prospèrent à un pH de 9. Parmi eux, on reconnaît les alcaliphiles, dont le pH optimal pour la croissance est inférieur à 9, et les alcalitolérantes, capables de se développer à pH 9 mais avec un pH optimal proche de la neutralité. Les bactéries alcalines peuvent également être halophiles et peuvent pousser dans des environnements avec des concentrations de sel proches de la saturation (35% de NaCl), telles que les lacs salés, les déserts salés et les sources alcalines. L'alcalinité de l'environnement ambiant est causée par la teneur élevée en carbonates, mais le niveau de salinité détermine comment un environnement diffère d'un autre.

Les produits issus de micro-organismes alcalophiles, en particulier les enzymes, ont un potentiel industriel important, notamment dans les industries alimentaires, des détergents, du papier et du textile (**Sarethy et al, 2011**).

I.1.1.2. Les milieux acides

Les milieux acides ou les environnements acidophiles comprennent les lacs acides, Sources hydrothermales, sources chaudes sulfurées, les organismes vivant dans ces milieux sont dits acidophiles. Les bactéries acidophiles qui se développent de façon optimale à un pH de 2 sont très rares dans le monde (**Morozkina et al, 2010**) et généralement qui se développent à un PH inférieur à 4 sont riches en métaux lourds (fer, arsenic, cuivre, zinc, chrome...) et des métalloïdes. Pour obtenir de l'énergie, les acidophiles ont un métabolisme acido _chimio_ lithotrophique oxydent les minéraux contenant du soufre ou le soufre électrique dans les zones volcaniques, créant des environnements extrêmement acides (**Rohwerder et Sand, 2007**). L'acidité extrême provoque la destruction des protéines.

L'écosystème acide le plus étudié est le Rio Tinto en Espagne, qui a un pH inférieur à 2, une concentration significative de métaux lourds et un degré étonnant de diversité microbienne (**Fardeau et al, 2005**).

I.1.1.3. Les milieux psychrophiles

Le terme « psychrophile » désigne les personnes qui vivent dans des environnements à basse température 0°C et qui peuvent survivre dans une variété d'environnements (**Dietrich et al, 2023**), y compris les régions arctiques, les glaciers pour les températures extrêmement froides et les océans profonds pour les températures modérément chaudes (environ 4 ° C). La plage de température idéale pour les soi-disant bactéries psycho tolérantes serait comprise entre 20 et 35 degrés.

I.1.1.4. Les milieux thermophiles et hyper thermophiles

Les températures de croissance idéales pour les procaryotes thermophiles et hyper thermophiles sont respectivement de 60 °C et 80 °C (**Forterr et al, 2007**). Ces micro-organismes se trouvent dans des environnements naturellement répartis géothermiquement qui sont répandus sur toute la planète, et souvent liés à la zone tectonique active (**Figure 1**).



Figure 1 : Vue d'ensemble des dépôts hydrothermaux de sels chargés en métaux à Dallol (Afar, Éthiopie) et riches en microorganismes (**Grégory, 2016**).

I.1.1.5. Les milieux piézophiles (barophiles)

La piézophilie est la capacité d'un organisme à croître sous pression hydrostatique (**Yayanos, 1995**). Le mot piézophile, anciennement barophile, provient du grec « piezo » pour presser et « phile » pour aimer.

Zobell et Morita (1957) ont été parmi les premiers à tenter d'isoler les micro-organismes adaptés à la croissance à des pressions élevées supérieures à 40 MPa (Méga pascal). En revanche, les microorganismes barotolérants présentent une croissance optimale à des pressions inférieures à 40 MPa et fonctionnent bien à la pression atmosphérique (**Yayanos et al, 1979**).

De tels micro-organismes peuvent résister à des pressions allant jusqu'à 130 MPa et ont été découverts dans les grands sédiments marins de l'océan profond à des profondeurs de 10 500 mètres (Irwin et Baird, 2004). Par exemple, *Pyrococcus* et *Thermus* (**Abe et Horikoshi, 2001**). D'autres micro-organismes peuvent pousser dans une variété d'environnements extrêmes, tels que les solfatares.

I.1.1.6. Les milieux halophiles

Les deux parties du mot "halophile" sont "Halos = sel" et "Phil = amour". Le terme « hyper saline » ou « sursaline » désigne les environnements où le niveau de salinité est supérieur à celui de l'eau de mer (35 g/l) l (**DasSarma et DasSarma, 2017**). Dans ces environnements, on trouve un certain nombre de lacs de taille continentale dans les régions semi-arides ou arides, les marécages de sel, et ceux qui ont été étudiés plus récemment comprennent le Grand Lac Salé dans l'ouest des États-Unis et la Mer Morte au milieu du Moyen-Orient (**Toffin, 2020**).

En fait, la grande variété au sein des écosystèmes terrestres de sel et d'hyper Salt reflète la diversité de leurs propriétés. Ces propriétés sont principalement définies selon l'attention totale en sel et la composition ionique (**Rodriguez- Valera, 1993 ; McGenity *et al*, 2000 ; Oren, 2002 et 2006**). Les environnements hyper salins sont divisés en thalassohalin (climats hyper salés qui ont pour origine de l'évaporation des eaux de mer dont leur composition ionique est la même) et athalassohalins (formée à partir des dépôts de sels dus aux évaporations dans les eaux intérieures ; ils ne sont pas d'origine marine dont la composition ionique diffère de celle de l'eau de mer (**Sylvie *et al*, 2008**) (**Figure 2**).



Chott Melghir (Biskra)



Chott El Bieda Hammam (Sétif)



Mer morte



Lac Magadi

Figure 2: Exemples d'environnements hypersalins athalassohalins (**Besse, 2016; Khallef, 2019 ; Menasria, 2020**).

La figure 3 montre une vue aérienne de Gruissan avec les marais salants au centre de l'image. En bas à gauche, vue d'un bassin de pré-concentration du sel. En bas à droite, gros plan sur le tapis algo-bactérien rose qui tapisse le fond du bassin.



Figure 3: Les marais salants de Gruissan (Aude) et leur couleur rose caractéristique à certaines saisons (**Google Earth - Pierre Thomas, 2018**)

I.2.1. Les sols salins

À l'échelle mondiale, plus de 200 millions d'hectares de sols sont touchés par la salinisation, ce qui correspond à environ 20 % de la superficie des terres cultivées. Il existe diverses sources de sels qui contribuent à la salinité (**Abdelhafid, 2010**). Les sols sont considérés comme salins lorsqu'ils contiennent un excès de sels solubles, dont la plupart comprennent des chlorures, des sulfates et des bicarbonates de sodium, de calcium et de magnésium, avec pH inférieur à 8,5 et une électro conductivité supérieure à 4 dS.m⁻¹ (**Mindari et al, 2015**).

Les sols salins ou sols halomorphes appelés aujourd'hui sols salsodiques couvrent de vastes étendues de la planète (**Ghosh et al, 2019**). Ils sont présents naturellement dans les zones climatiques tempérées, maritimes ou continentales, ainsi que dans les régions plus ou moins arides. C'est là que l'évaporation dépasse les précipitations pluviales (**Bouteyre et Loyer, 1992**). Selon le niveau de salinité atteint, La présence de ces sels et l'élévation résultante de la pression osmotique de la solution du sol donnent lieu à la formation de paysages uniques, soit occupés par une végétation naturelle halophytes (chotts), soit dépourvus de toute végétation (sebkhas) (**Loyer, 1991**).

I.2.2. La salinisation des sols

Un sol est considéré comme salé si sa conductivité électrique est supérieure à 4 dSm⁻¹ et si sa teneur en sodium échangeable est supérieure à 15% (**Shrivastava et Kumar, 2015**). Le processus de salinisation est défini comme l'accumulation de sels à des niveaux nocifs sur les surfaces du sol et dans les zones racinaires des plantes, souvent sous la forme d'un mélange de cations (Na^{2+} , K^{+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) et d'anions. (Cl^{-} , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HCO_3^{-}) (**Ghassemi et al, 1995**). Ainsi, une tension hydrique résulte de ces concentrations de sel élevées. Environ 20 % des zones irriguées et 6 % de la surface terrestre du monde sont affectés par la salinité, ce qui constitue une menace sérieuse pour l'agriculture en réduisant la disponibilité des nutriments pour les cultures. Par exemple, le phosphate a une propension à précipiter avec le calcium dans les sols salés, ce qui rend difficile pour les plantes de l'absorber (**Singh et Singh, 2013**).

De plus, la salinité peut avoir un impact sur la photosynthèse, les processus métaboliques des graisses et la synthèse des protistes (**Rojas-Tapias et al, 2012**). Ce problème n'est pas limité à l'accélération de la croissance et du rendement des plantes, mais aussi à un déséquilibre de croissance des micro-organismes dans les régions rhizosphériques. Cela affecte les relations symbiotiques entre les plantes et les micro-organismes et, dans

certains cas, augmente la virulence des germes phytopathogènes présents dans la rhizosphère. **(Dikilitas et Karakas, 2012).**

I.2.3. Sebkha

Le mot 'sebkha' est d'origine arabe et décrit une cavité fermée sous la forme : bassins dans les zones désertiques. Ils ne sont remplis d'eau que pendant une courte période.

L'évaporation intense forme des dépôts de sel qui recouvrent le fond de ces dépressions, dépourvue de végétation (où le sel s'accumule). Sebkha représente un bassin qui occupe le fond de la plaine est fortement salinisé et plus ou moins isolée du milieu marin, dans des zones sèches. Quant au terme de Chott ne décrit que le halo plus ou moins large entourant Sebkha **(Romanescu et al, 2013).**

Cependant, il peut périodiquement déborder en raison du contact avec de très petites gouttelettes (cuvettes d'eau profonde) ou, à l'inverse, des infiltrations (cuvette d'eau peu profondes). Dans les deux cas, une augmentation de la salinité est observée. Ils sont principalement situés en Afrique du Nord et au Moyen-Orient.

I.2.4. Origine et genèse des sels

Un sol salin se développe généralement à la suite de l'accumulation des sels très soluble dans les couches de la surface, ce qui réduit la fertilité du sol **(Souguir et al, 2013)**. Ce processus dépend principalement de l'équilibre des eaux du sol et de la disponibilité des sources de sel **(Essinyton, 2004)**. Le processus de l'accumulation de sels minéraux solubles dans le sol entraîne des niveaux toxiques pour les plantes. Ces sels solubles sont un mélange d'anions (Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HCO_3^-) et de cations (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}). La salinisation des sols peut être causée soit par l'un des processus naturels : salinisation primaire ou être induite par des activités humaines : salinisation secondaire **(Ghassemi et al, 1995)**.

- Salinisation primaire par les sels formés in situ lors de l'altération de la roche. Le transport et le dépôt de ces substances solubles dépendent de l'intensité et de la distribution des précipitations, de la porosité du sol et d'autres propriétés de l'environnement naturel **(Loyer, 1991; Chevery, 1995)**.

- Salinisation secondaire affectant plus de 76 millions d'hectares de terres dans le monde **(Ghassemi et al, 1995)**, est une réaction en chaîne qui inclut l'irrigation inappropriée avec une eau de mauvaise qualité (entraînant une dégradation chimique et physique des sols), lessivage inadéquat, le drainage insuffisant, l'infiltration des canaux voisins et d'autres zones **(Badraoui et al, 1998 ; Chevery et Bourrier, 1998 ; Askri et al, 2003 ; Messahel et Meza,**

2003).

I.2.5. Répartition géographique des sols salés dans le monde et dans l'Algérie

La salinisation touche environ de 1 milliard d'hectares dans le monde ce qui représente autour de 7% de la surface terrestre de la planète, ils sont concentrés dans les zones à climat aride et semi-aride (**Sougueh-Cheik, 2021**), où le potentiel d'évaporation est élevé et les précipitations limitées (environ 25% de la surface cartographiées en Algérie (**Halitim, 1988**). On les rencontre aussi dans les climats subhumides et même humides (**Durand, 1983 ; Szabolcs, 1994**). Ils se rencontrent en Afrique, l'Europe, Amérique de nord et de sud ainsi que tous les pays asiatiques sont concernés par le sel sauf la Turquie (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Superficie affectée par la salinité dans le monde (FAO, 2008).

Région	Superficie (millions d'hectares)
Afrique	80,5
Europe	58,8
Amérique de Sud	129,2
Amérique de Nord	15,7
Australie	357,3
Mexique et Amérique centre	2
Asie et Sud Est	20
Asie de centre et de Nord	211,7
Asie de sud	87,6
Total	954,8

I.2.6. Répartition de Sebkhia en Algérie

Plus de 20 %des sols irrigués sont affectés par des problèmes de salinisation (**Douaoui et Hartani, 2008**). Ces terrains salins s'étendent sur de vastes surfaces. Selon l'étude de **Houerou en 1993**, les sols salins se répartissent au nord et au sud.

En Algérie, sept chotts et sebkhas ont été recueillies aseptiquement à différents endroits du Sahara algérien. Nous avons trouvé :

- Chott Melghir (Biskra) au nord-est du Sahara en Algérienne.
- Sebkha Ezzmoul (Ain M'Lila) au nord-est de l'Algérie,
- Sidi Ameur (Bousaâda).
- Sebkha El-Goléa (El Menia) au centre du Sahara algérienne et au sud-ouest de l'Algérie.
- Sebkha Adrar au nord et Sebkha Illizi (Bordj Omar Idris) au sud-est.
- Au sud-est des régions Illizi, Ouargla et Biskra Au Nord-Est.
- En particulier dans la région située les Wilayas de M'sila, Sétif, Batna, Oum El Bouaghie, Annaba et Taref.

I.2.7. Influence des sels sur les communautés microbiennes des sols

Fréquemment, les micro-organismes dans leurs territoires naturels sont exposés à des variations de pression osmotique du terrain environnant. En effet, la salinité élevée du terrain peut interférer avec la croissance et l'activité des bactéries **(Rabhi, 2011)**.

Dans le cas où la salinité du terrain diminue, il y' aura accumulation de la matière organique non dégradée, ce qui agit négativement sur la disponibilité des nutriments nécessaires à la croissance des plantes **(Zahran, 1997)**. Et dans le cas où il y a addition de ce facteur, cela peut engendrer une révision de la disponibilité de l'eau à la cellule **(Csonka, 1989)**.

I.3.1. Diversité phylogénétique des halophiles

Les milieux à forte salinité se caractérisent par une importante diversité phylogénétique appartenant aux trois domaines de la vie (**Oren, 2002**). Les eucaryotes sont moins fréquents que les procaryotes dans ces environnements, qui sont dominés par des organismes du domaine Prokaryota tels que les bactéries et les archées. Cependant, il existe certains organismes qui sont fréquemment trouvés dans les habitats halophiles, tels que les champignons photosynthétiques, les protistes, les hétérotrophes et les crustacés. En outre, dans les environnements hypersalins sont pris en compte les virus qui jouent un rôle dans la dynamique des populations (**Singh et al, 2017**).

L'arbre phylogénétique comprend une variété de microorganismes appartenant à divers genres, familles et ordres avec une variété des besoins et une tolérance en sel, et des organismes halophiles et non halophiles se trouvent ensemble.

Il y a trois domaines de la vie où les organismes halophiles peuvent être trouvés : Archaea, Bacteria et Eucarya (**Figure 4**).

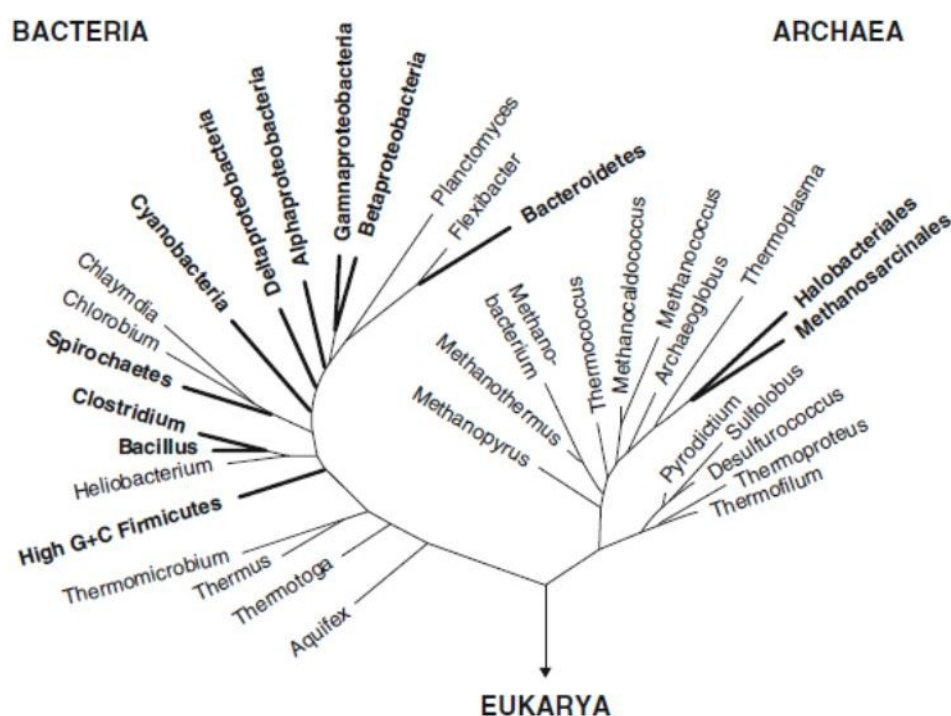


Figure 4 : Arbre phylogénétique universel basé sur le séquençage du gène d'ARNr (16S). Adaptée par Edbeib *et al*, (2016). Les branches dans lesquelles des bactéries halophiles et halotolérantes ont été décrites (Les microorganismes qui se développent bien à des concentrations en sel supérieures à 100g/l sont indiqués en gras.

I.3.1.1. Eucaryotes halophiles

La présence des microorganismes halophiles dans le domaine *Eukarya* est rare. La majorité des eucaryotes halophiles sont modérés ou halotolérants, mais certaines espèces extrêmement halophiliques ont été identifiées (**Oren, 2004**). Les espèces hypersalines planctoniques les plus couramment observées sont les algues vertes unicellulaires *Dunaliella salina* et *D. parva*, qui peuvent être trouvées dans un large éventail de concentration de sel allant de 9 à 250 g/L (**Esmaeili Daheht et al, 2010 ; Oren, 2020**). La communauté fongique isolée est représentée par des espèces telles que *Debaryomyces hansenii*, *Hortaea werneckii*, et *Wallemia ichthyophaga* (**Gunde-Cimerman et al, 2009**) mais les protozoaires les plus intensément caractérisés appartiennent aux genres *Heterolobosea*, *Bicosoecida* et *Ciliophora* (**Park et Simpson, 2015 ; Harding et Simpson, 2018**).

I.3.1.2. Archaea halophiles

Dans le phylum *Euryarchaeota*, les archées de la classe des *Halobacteria* forment un groupe phylogénétiquement cohérent qui ne contient que des halophiles. La classe est maintenant divisée en trois ordres (*Halobacteriales*, *Haloferacales* et *Natrialbales*) et six familles (*Halobacteriaceae*, *Haloarculaceae*, *Halococcaceae*, *Haloferacaceae*, *Halorubraceae* et *Natrialbaceae*) (**Oren et al, 2017**).

On pense généralement que les halobactéries sont des hétérotrophes aérobies qui utilisent des sources simples de carbone organique. Certains peuvent croître par respiration anaérobie ou par fermentation, et la présence de la bactériorhodopsine, peut favoriser un mode de vie photohétérotrophique (**Andrei et al, 2012**). Récemment, il a été proposé que les membres des halobactéries puissent utiliser des composés contenant de l'arsenic pour des processus bioénergétiques (**Ordoñez et al, 2018**).

I.3.1.3. Bactéries halophiles

Le domaine *Bacteria* contient les halophiles les plus divers représentés principalement par des espèces qui sont halotolérantes et modérées plutôt que des halophiles extrêmes (**Anton et al, 2002**). Elles sont contenues dans 5 phyla : Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Spirochaetes et Bacteroidetes (**Haba et al, 2011**).

Cependant, la majorité des bactéries halophiles modérées peuvent être soit facultativement Gram positif ou Gram négatif, hétérotrophes, aérobies ou anaérobies facultatives. L'un des principaux groupes du domaine *Bacteria* est les actinobactéries (**Subramani, et Sipkema, 2019**). Ces bactéries sont répandues dans divers habitats, y compris les déserts, les marais

salants, les mines de sels, les sols salins, les lacs et étangs hypersalins. De plus, de nombreuses espèces d'actinobactéries halophiles, en particulier celles qui sont halotolérantes ont été citées dans la littérature notamment des espèces halophiles du genre *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Haloactinopolyspora*, *Haloglycomyces*, ainsi que *Glycomyces* (**Tang et al, 2010 ; Guan et al, 2011 ; Mohammed et al, 2018**). Cet organisme partage de nombreuses caractéristiques avec ses homologues archéens halophiles qui vivent dans les mêmes habitats hypersalins, et nécessite des niveaux de salinité aussi élevés que la plupart de l'Archée halophile (croissance optimale à une concentration saline de 200-300 g/l).

I.3.2. Définition des bactéries halophiles

Les bactéries halophiles sont des bactéries qui peuvent survivre et se développer dans des conditions de salinité très élevée que d'autres organismes seraient impossibles de tolérer. Elles appartiennent aux bactéries extrémophiles, qui sont celles qui peuvent prospérer dans des conditions extrêmes) (**Ramírez et al, 2004**).

Elles sont capables d'équilibrer la pression osmotique du milieu et de résister à l'effet de la dénaturation provoqué par le sel (Grant et al, 2001). Ces bactéries, elles incluent une grande diversité d'organismes, comme les bactéries aérobies modérément halophiles, les cyanobactéries, les bactéries sulfo-oxydantes, les bactéries hétérotrophes, les bactéries anaérobies ...etc.

Les caractéristiques les plus importantes des bactéries halophiles sont :

- Ce sont des organismes unicellulaires et bactériens.
- Elles possèdent généralement des pigments rouges ou violets pour absorber la lumière du soleil.
- Elles peuvent faire de la photosynthèse.
- Elles sont osmorégulées dans leurs membranes et leur cytoplasme : cela les empêche de se décomposer à cause des changements de sel.

Les micro-organismes halophiles sont une source de biomolécules aux fonctions, propriétés et structures variées et originales qui sont exploitées dans de nombreuses applications biotechnologiques et font pour la plupart partie de notre quotidien.

I.3.3. Habitat des bactéries halophiles

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

Les bactéries halophiles sont présentes là où il y a de fortes concentrations de sel, dans les lacs hypersalins (**Oren, 2011**) comme les Grands Lacs Saumâtres dans l'Ouest américain, le Lac Rose au Sénégal, la Mer Morte et les sols salins dans certains endroits inattendus ainsi que la saumure au fond de la mer, chez les plantes qui sécrètent du sel par leurs feuilles, les marais d'Afrique du Nord, les marais salants d'Espagne, de France, les mines de sels où la salinité est bien supérieure à celle des océans (3,5 % de Na Cl). La majorité de ces zones se trouvent dans des endroits secs et chauds. De tels écosystèmes à forte salinité existent à n'importe quel endroit du monde, les halophiles sont donc une espèce cosmopolite (**Roza Maria Camacho Ruiz, 2019**).

Ces espèces peuvent vivre aussi sur les dépôts de sel et les produits alimentaires fermentés au sel tels que les sauces de poisson, les peaux d'animaux, etc... La diversité des bactéries vivant dans ces biotopes dépend principalement de la salinité, de la solubilité en oxygène, de la solubilité ionique, de l'humidité, de la température, de la structure ionique et dans certains cas le pH.

I.3.4. Classification des bactéries halophiles

Plusieurs classifications basées sur les besoins et les tolérances au sel des halophiles peuvent être rencontrées, car il existe une variété de concentrations qui influencent la croissance microbienne, pouvant être ainsi optimales pour certains ou minimales voir maximales pour d'autres (**Oren, 2002**). Donner alors une définition par un intervalle précis de ce qu'est un halophile est impossible (**Oren, 2008**).

En 1962, Larsen a défini 3 catégories de bactéries halophiles (Figure 5) qui sont :

- Faiblement halophiles : ont une croissance optimale dans des milieux ayant une concentration en sel allant de 1 à 6% (p/v).
- Halophiles modérés : ont une concentration en sel allant de 3 à 15% (p/v).
- Halophiles extrêmes : ont une concentration en sel allant de 15 à 30% (p/v).

Par ailleurs, les bactéries halotolérantes acceptent des concentrations modérées en sels mais non obligatoires pour leur croissance.

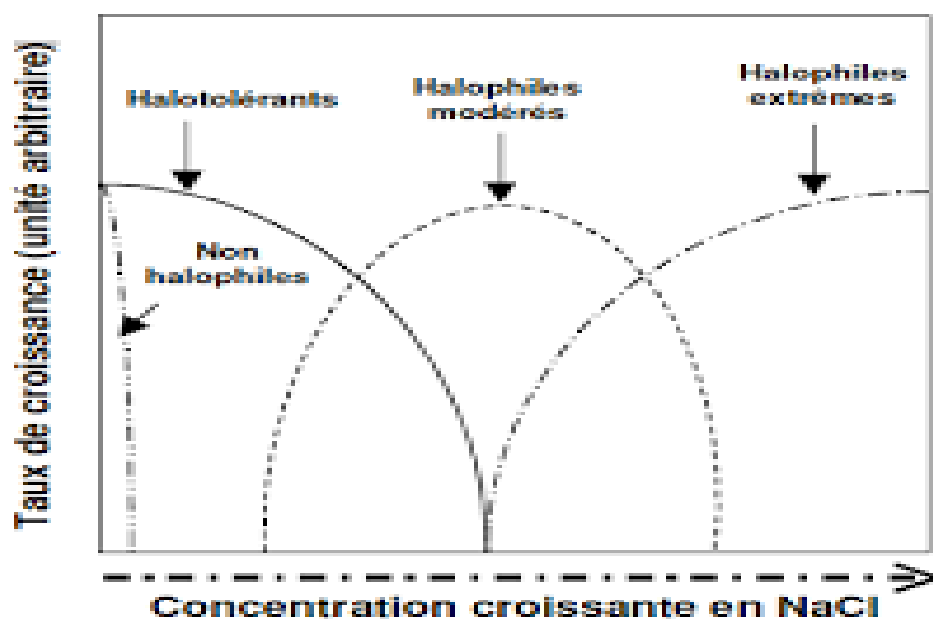


Figure 5 : Différents groupes de microorganismes halophiles (**Larsen, 1962**)

Mais actuellement, la classification la plus rencontrée et la plus utilisée est celle de **Kushner et Kamekura (1988)** qui ont défini 5 groupes de microorganismes halophiles (**Tableau 3**) qui sont classés selon leurs exigences en sel pour une croissance optimale.

Tableau 3: Classification de microorganismes halophiles basée sur la tolérance au sel (**Kushner et Kamekura, 1988**).

Nom	Tolérance au sel (NaCl)
Non halophiles	0,2 M (approx. 1%)
Halophiles légers	0,2-0,5 M (approx. 1%-3%)
Halophiles modérés	0,5-2,5 M (approx. 3%-15%)
Halophiles à bord extrêmes	1,5-4,0 M (approx. 9%-23%)
Halophiles extrêmes	2,5-5,2 M (approx. 15%-32%)

I.3.5. Méthodes d'adaptation des bactéries halophiles

Selon **Berregui et Bireche (2014)** les microorganismes halophiles et halotolérants utilisent différents mécanismes pour une meilleure adaptation à la pression osmotique exercée par la très haute salinité du milieu. Deux principales stratégies sont employées par différents groupes de microorganismes.

I.3.5.1. Adaptation à la salinité par la production d'osmoprotecteurs

L'une des stratégies utilisées par les microorganismes pour atteindre l'équilibre osmotique au sein de milieux très salés (**Gunde-Cimerman et al, 2018**) L'adaptation est

basée sur l'expulsion des sels du cytoplasme et l'accumulation de solutés organiques, ces derniers peuvent être des acides aminés, des sucres, des polyalcools et des ectoïne (acides aminés cycliques) (**Berregui et Bireche, 2014**). Comme on peut trouver la glycine betaine (GB) qui est une molécule osmoprotectrice la plus puissante. Elle est fréquemment accumulée par de nombreux microorganismes halophiles (**Rabhi, 2011**). Dans ce cas, les osmoprotecteurs peuvent être des solutés compatibles inoffensifs, comme ils pourraient jouer un rôle protecteur actif interagissant avec les protéines et les protègent de cette façon de l'action destructrice due à l'osmolarité (**Papageorgion et Murata, 1995**).

I.3.5.2. Adaptation à la salinité par accumulation de KCl

Cette stratégie est adoptée par des groupes de bactéries halophiles anaérobies et aérobies. Ils accumulent essentiellement du KCl. L'exclusion du Na^+ du cytoplasme se fait grâce à un antiport Na^+/H^+ , localisé au niveau de la membrane cytoplasmique. Généralement, les ions K^+ entrent passivement via un système uniport sous l'impulsion du potentiel de la membrane. Ce système revient à remplacer une partie du sodium cellulaire par du potassium. Des systèmes multiples de transport actif des ions K^+ (**Oren, 2001 ; Oren, 2002 ; Grant, 2004**).

I.3.6. Diversité métabolique de microorganismes halophiles et halotolérants

Le schéma global des réactions biochimiques d'une cellule est appelé métabolisme. Tous les organismes cellulaires ont un processus métabolique unique. C'est une série de processus de décomposition (catabolisme) et de synthèse organique (anabolisme). Les nutriments sont utilisés par les cellules et les transforment pour fournir l'énergie dont elles ont besoin pour leur croissance et leur reproduction. Elles stockent une partie de l'énergie présente dans ces substances dans un état assimilable ainsi que les composants nécessaires à la synthèse de macromolécules puis avant d'éliminer les déchets.

La diversité métabolique des microorganismes halophiles et halotolérants est significative dans la nature (**Oren, 2008**). Des exemples de ces microorganismes comprennent une variété d'Archaea hétérotrophes et méthanogènes comme exemples tous les membres de la famille Halobacteriaceae sont des chimiohétérotrophes et la grande majorité sont des aérobies. Il y a plusieurs caractéristiques physiologiques des bactéries halophiles et halotolérantes, y compris les lithotrophes photosynthétiques et hétérotrophes. Les eucaryotes sont souvent photosynthétiques et hétérotrophes (**Jiang et al, 2006**).

La plupart des processus microbiens qui se produisent à faibles concentrations de sel peuvent être effectués à des concentrations élevées. Cependant, certains processus qui ont été observés dans des environnements moins salés n'ont pas encore été observés dans des

milieux avec des concentrations élevées de sel . Des exemples de ce processus comprennent la nitrification et la formation du méthane à partir du CO_2 et H_2 et de l'acétate.

I.4.1. Définition

Les bactéries gram positives appartenant à la famille des Bacillaceae servent de représentants du genre *Bacillus*. Ce sont des aérobies, aéro-anaérobies facultatifs qui obtiennent leur énergie par respiration ou fermentation. La majorité des bactéries de ce groupe ont la capacité de produire des spores (éléments sphériques à paroi épaisse), ce qui leur donne la possibilité de résister à des conditions environnementales difficiles telles que la déshydratation, y compris les températures élevée, l'absence des nutriments ou à la dessiccation.

I.4.2. Taxonomie

Le genre *Bacillus* est largement répandu dans la nature, et leur taxonomie a été auparavant axée sur leurs traits morphologiques, biochimiques et physiologiques ainsi que leur capacité de sporulation (**Bron et al, 1999**). Il appartient à la famille des bacillaceae, ordre des bacillales, classe des bacilli, phylum des firmicutes. La première étude taxonomique complétée sur le genre *Bacillus* a été publiée par (**smith et al, 1952**), elle est basée sur une comparaison entre 1134 isolats qui représentent collectivement plus de 150 espèces.

De nombreuses espèces qui ont été initialement classées comme *Bacillus* ont été transférées à d'autres genres apparents. Néanmoins, le genre *Bacillus*, qui comprend plus de 200 espèces, est toujours considéré comme l'un des plus grands genres (**Zhang et al, 2009**).

I.4.3. La classification

La classification couramment utilisée est basée sur la localisation des spores et la morphologie. Elle divise le genre *Bacillus* en 03 groupes :

Groupe I : composé de bacilles à Gram positif avec des spores centraux ou terminaux, sphérique ou ovoïde qui ne déforment pas la cellule. Ce groupe est divisé en 02 sous-groupes ; le groupe IA qui comprend les bacilles ayant un diamètre supérieur à 1 µm et contenant *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycoides* et *B. weihenstephanensis* ; et le groupe IB rassemblant les Bacilles d'un diamètre inférieur à 1 µm : *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* et *B. pumilus*.

Groupe II : il est composé des espèces à Gram variable présentant une spore ovoïde, centrale ou terminale, déformante telle que *B. circulans*, *B. stearothermophilus*

Groupe III : composé de bacilles à Gram variable et présentant une spore sphérique, déformante, terminale ou subterminale : *B. fusiformis*, *B. Globisporus*....

I.4.4. Caractères bactériologiques

Le genre *Bacillus* désigne un groupe de bactéries hétérogènes qui sont sporulées, gram positif ou gram négatif avec des extrémités arrondies, et ont une forme de bâtonnets droit ou légèrement courbés, avec une taille variable (de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm), à l'exception des membres du *Bacillus cereus* qui ont des cotés carrés, d'une longueur comprise entre 0.9 et 10.0µm. Ces bactéries sont immobiles ou mobiles par des flagelles péritriches, aérobies ou anaérobies facultatives, tandis que certaines espèces peuvent être anaérobies strictes. Elles peuvent produire des endospores qui sont résistants à différentes conditions, y compris la température, le rayonnement, les désinfections et la dessiccation... (De Vos *et al*, 2009).

Ces bactéries peuvent être trouvées isolées, en paires ou en chainettes. Elles sont catalase positive, et ont la capacité de se développer sur des milieux communs tel que la gélose nutritive. La morphologie de leurs colonies varie considérablement au sein et entre les espèces. Cette morphologie est influencée par la composition du milieu de culture et les conditions d'incubations. Cependant, malgré cette diversité, il n'est pas difficile d'identifier des colonies du genre *Bacillus* (De Vos *et al*, 2009) (Figure 6).

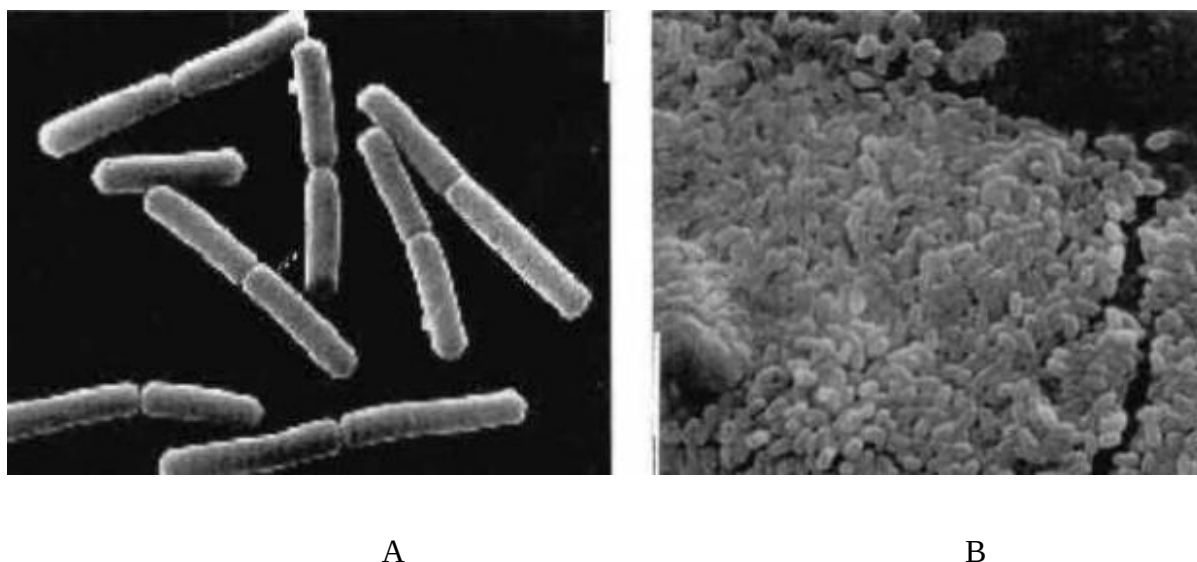


Figure 6: Caractéristiques morphologiques des *Bacillus* (A: Cellules végétatives, B: Spores) (Cheikh-Rouhou, 2006).

I.4.5. Les caractères physiologiques

Des caractères physiologiques impressionnants peuvent être trouvés dans le groupe des *Bacillus*. Ils peuvent décomposer la majorité de la matière organique animale ou végétale (cellulose, amidon, protéines, hydrocarbures...) en produisant des enzymes extracellulaires. Il

peuvent également produire des antibiotiques peptidiques, des molécules peptidiques de signal. Ils sont hétérotrophes, nitrifiants, dénitrifiants, fixateurs d'azote, récepteurs de fer, oxydants le sélénium, oxydants et réduisant le manganèse.

Ces microorganismes ont des capacités extraordinaires qui leur permettent de survivre dans des environnements extrêmes, elles peuvent être thermophiles, psychrophiles, acidophiles, alcalophiles, halotolérants ou halophiles (**Awais et al, 2007**) et ils peuvent pousser à des niveaux de pH, de température et de salinité où peu d'autres organismes peuvent survivre. Elles sont chimio-organotrophes ou chimio-lithotrophes, certaines espèces sont prototrophes et d'autres auxotrophes nécessitent des facteurs de croissance (**De Vos et al, 2009**). Nous savons très peu de choses sur l'écologie du *Bacillus* en raison de cette variabilité physiologique.

I.4.6. Habitat

Les bactéries telluriques connues sous le nom de *Bacillus* sont répandues dans la nature, en particulier dans le sol, où ils jouent un rôle dans les cycles de carbone et de l'azote (**Turnbull et Kramer, 1995**). Les bactéries qui peuvent être isolées du sol, de l'eau de mer, de l'eau douce ou des déchets alimentaires sont assez courantes en raison de la résistance aux spores et de la diversité physiologique des formes végétatives (**Tortora et al, 2003**). Elles peuvent également être trouvées dans l'air où ils peuvent occasionnellement contaminer les cultures en boîtes de Pétri lors d'expériences de microbiologie lorsque les consignes d'ensemencement ne sont pas suivies exactement (**Camille, 2007**).

La variété phénotypique environnée des membres de *Bacillus* est étonnante, ils prospèrent dans des environnements extrêmes et sont repartis selon les facteurs physiques (pression, température...) ou chimiques (acidité, salinité...) et même le système immunitaire de nombreux animaux n'empêche pas la croissance de certains membres (**Maughan et Vander Auwer, 2011**).

I.4.7. Le pouvoir pathogène

Étant donné que l'épidémiologie de certaines maladies dépend de la sporulation, la résistance aux spores est un problème médical important. Dans le contexte industriel (**Logan et al, 1999**) (industries agro-alimentaires, industries du médicament, production de matériel stérile à usage unique), les problèmes causés par l'adhésion des spores s'ajoutent au phénomène de résistance.

Un petit nombre d'espèces du genre *Bacillus* est nocive pour l'Homme. L'agent causal de l'anthrax, parfois connu comme la maladie du carbone, est *Bacillus anthracis* (**Prieur, 2008**).

Cette bactérie se distingue par sa capacité à être nocive pour les humains et les animaux. La synthèse d'une capsule qui rend les bactéries résistantes à la phagocytose et la sécrétion d'un toxine puissant sont responsables de la pathogénicité de *B. anthracis* (Prieur, 2008). *Bacillus cereus*, d'une autre part est son rôle dans l'intoxications alimentaires (Organji et al, 2015). Elle provoque la contamination des aliments et occasionne deux types de maladies distinctes en fonction de la toxine qu'elle produit : la vomitoxine et une entérotoxine (Louami, 2012). D'autres souches de ce genre, bien que non pathogènes pour l'homme, sont pathogéniques pour certains groupes d'insectes ou de parasites: elles sont utilisées par l'industrie agricole dans la lutte biologique (Krieg et al, 1981).

I.4.8. Les Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

Le terme PGPR « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » qui est dérivée de l'anglais, se réfère aux bactéries qui influencent positivement la Croissance et le développement des plantes de diverses manières (Abnatura, 2013). Leur abondance dans le sol s'explique par leur multiplication rapide et leur capacité à utiliser une grande variété de substrats comme source d'énergie et de matériaux riches en nutriments.). Généralement, ce sont des microorganismes du sol très compétitifs qui peuvent coloniser les systèmes racinaux des plantes riches en matériaux nutritifs.

Selon leur relation avec leurs plantes hôtes, les PGPR sont divisés en deux groupes principaux : les bactéries libres (non rhizosphériques), celles qui vivent dans le sol et ne dépendent pas des exsudats de racines pour leur croissance, et les bactéries symbiotiques qui ont un impact direct sur les constituants organiques de la racine. Les types les mieux étudiés de PGPR sont : *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* et *Rhizobium* qui favorisent la croissance des plantes par des mécanismes directs et/ou indirects (Kloepper et al, 1999, Barraquio et al, 2000 ; Ahmad et al, 2008 ; Wang et al, 2014).

I.4.8.1. Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes par les PGPR

Grâce à un certain nombre de mécanismes, notamment la solubilisation des minéraux, l'apport d'éléments nutritifs, la stimulation de la croissance des racines (Martinez- Viveros et al, 2010), la synthèse d'enzymes hydrolisantes, l'élimination des agents phytopathogènes par la compétition et l'induction des mécanismes de défense des plantes (Antoun et Prévost, 2005), les PGPR ont un impact sur la santé et la productivité des plantes. Ces mécanismes, directement ou indirectement, affectent la croissance des plantes (Kloepper, 1993 ; Glick et al, 1999 ; Vessey, 2003 ; Martinez- Viveros et al, 2010).

I.4.8.1.1. Les mécanismes directs

Il existe plusieurs processus qui peuvent entraîner une stimulation directe de la croissance des plantes.

I.4.8.1.1.1. La fixation d'azote

Le facteur de limitation le plus commun est l'azote, qui est un aliment essentiel bien connu pour la croissance et le développement des plantes. Il se trouve souvent sous forme gazeuse (N₂), inaccessible aux plantes et aux animaux. Les PGPRs qui sont les plus connus pour leur capacité à fixer l'azote atmosphérique comprennent : *Azoarcus sp.*, *Burkholderia sp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* ; *Azotobacter* *Paenibacillus* et *Azospirillum brasilense*, qui utilisent un système enzymatique élaboré connu sous le nom de nitrogénase pour convertir l'azote atmosphérique en ammoniacque (Weyens et al, 2010 ; Arora et al, 2012).

I.4.8.1.1.2. Solubilisation du phosphate

Le phosphore est le deuxième élément le plus important après l'azote, c'est un nutriment essentiel pour la croissance et la productivité des plantes puisque les plantes ne peuvent absorber que ses formes solubles mono- et dibasiques. Il joue un rôle fondamental dans les processus métaboliques et il est présent sous forme insoluble, immobilisé et précipité. En outre, les microorganismes solubilisant le phosphate sont abondants dans le sol et la rhizosphère de la plupart des plantes, ils transforment les phosphates insolubles en forme soluble, libérant le phosphate lié à la solubilisation et à la minéralisation. Ceci est réalisé par l'acidification, la chélation et la production d'acides organiques tels que l'acide gluconique. Les espèces bactériennes *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* et *Serratia* sont capable de solubiliser le phosphate dans le sol (Arora et al, 2012 ; Bhattacharyya et al, 2012 ; Gupta et al, 2015).

I.4.8.1.1.3. La production de sidérophores

L'un des oligo-éléments les plus cruciaux pour la croissance microbienne, le fer agit comme un régulateur global de plusieurs processus cellulaires, métaboliques et biosynthétiques. Les bactéries aérobies produisent des métabolites secondaires connus sous le terme de sidérophores lorsqu'elles sont soumises à un stress. Bien que les champignons phytopathogènes produisent des sidérophores, ils ont généralement une faible affinité pour le fer que celles produites par les PGPRs (Schippers et al, 1987 ; Briat ,1992 ; Ratul, et al, 2012).

Les sidérophores fixent le fer ferrique (Fe^{3+}) et le transforment en sa forme soluble qui est le fer ferreux (Fe^{2+}). Ils sont également utilisés dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes en s'appropriant des ions ferriques présents dans la Rhizosphère, ils les rendent non disponibles aux champignons pathogènes, ce qui provoque une diminution de leur croissance (**Glick et Pasternak, 1998 ; Ongena et al, 2002**).

I.4.8.1.1.4. La production de phytohormones

Deux sources naturellement de phytohormones sont disponibles pour les plantes : synthèse endogène par les tissus végétaux et exogène par des micro-organismes associés. L'AIA (Acide indole acétique : auxines), l'acide gibbéréllique et les cytokinines sont parmi les phytohormones produites par les PGPR. Les processus biochimiques, physiologiques et morphologiques des plantes sont influencés par des petites molécules de signaux produites à des concentrations extrêmement faibles (**Han et al, 2005 ; Baca et Elmerich, 2007 ; Kloepper et al, 2007 ; Martínez-Viveros et al, 2010**).

L'auxine joue un rôle dans un certain nombre de processus, y compris la division cellulaire, la différenciation et le développement des faisceaux vasculaires, et a un impact positif sur le début de l'allongement et de la ramification des racines. Elle améliore l'absorption des minéraux et de l'eau (**Patten et Glick, 2002 ; Ahmad et Kibret, 2013 ; Gupta et al, 2015**). Les cytokinines et les gibbéréllines impliquées dans la l'altération de la morphologie des plantes et la stimulation de la croissance de la partie aérienne (**Van Loon, 2007**). Les Gibbéréllines ou (acide gibbéréllique) affectent un large éventail de processus de reproduction des plantes et retardent le vieillissement de leurs fruits et feuilles. Les cytokinines se trouvent dans les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs, les fruits et les graines, mais des preuves convaincantes suggèrent que la racine est le site principal de la biosynthèse de cytokinines (**Hopkins, 2003 ; De Salamone et al, 2005**).

I.4.8.1.2. Les mécanismes indirects

Elles se produisent par :

I.4.8.1.2.1. La compétition

Les PGPRs utilisent un mécanisme biologique appelé la compétition pour les nutriments et l'espace pour éliminer les phytopathogènes. Cette compétition entre deux ou plusieurs microorganismes affecte soit les composants nutritionnels, l'espace ou d'autres facteurs environnementaux qui deviennent limitants pour leur croissance (**Dommergues et Mangenot, 1970 ; Syed et Prasad, 2017**). L'interaction entre les bactéries bénéfiques et les agents

pathogènes est influencée par la densité et l'intensité de l'activité rhizobactérienne (**Jijakli, 2003 ; Podile et Kishore, 2006**). Cela signifie qu'un antagoniste efficace doit être un colonisateur agressif capable d'utiliser rapidement et efficacement les nutriments présents en faible concentration dans le sol.

I.4.8.1.2.2. L'antibiose

L'un des mécanismes utilisés par les PGPRs pour prévenir les attaques pathogènes est la production d'antibiotiques. C'est la stratégie utilisée par les agents de la lutte biologique qui a reçu la plus grande recherche (**Jijakli, 2003**). Il implique la création d'antibiotiques efficaces utilisant la substance antagoniste contre le pathogène. Ces molécules bioactives sont des métabolites secondaires à faible poids moléculaire tels que les antibiotiques comme l'amphotéricine, le 2,4 diacétylphloroglucinol (DAPG), cyanure d'hydrogène (HCN) et la phénazine, agissent comme inhibiteurs de l'attaque des agents pathogènes (**Corbaz, 1990 ; Babalola, 2010 ; Syed et Prasad, 2017**). Certains métabolites interfèrent avec la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des phytopathogènes ; en conséquence, ces molécules bioactives ralentissent ou arrêtent la croissance de l'agent pathogène (**Jijakli, 2003**).

I.4.8.1.2.3. Le parasitisme

Ce mécanisme de lutte implique une interaction directe entre deux microorganismes où les tissus vivants de l'un servent de base nutritionnelle pour l'autre (**Helluy et Holmes, 2005**). Il implique le microorganisme envahissant les cellules pathogènes. L'agent antagoniste utilisera des enzymes lytiques telles que les glucanases, les chitinases et les lysozymes pour décomposer les parois de l'agent pathogène (**Corbaz, 1990**).

I.4.8.1.2.4. La Résistance systémique induite « ISR »

En raison des interactions avec des rhizobactéries non pathogènes spécifiques au cours d'un phénomène connu sous le nom de ISR (Induced Systemic Resistance), les plantes peuvent commencer à exprimer des mécanismes de défense systémiques qui les rendent plus résistants aux attaques potentielles d'agents pathogéniques. (Virus, bactéries et champignons). De nombreux composants bactériens, y compris les lipopolysaccharides (LPS), les sidérophores et les lipopeptides Cycliques, peuvent provoquer une résistance systémique des plantes (**Gupta et al, 2015 ; Syed et Prasad, 2017**).

I.4.8.1.2.5. La production d'enzymes hydrolytiques

Les PGPR utilisent l'amélioration de la croissance par l'activité enzymatique comme mécanisme. Ces enzymes jouent un rôle important dans le processus global de dégradation de la matière organique dans les écosystèmes, protégeant les plantes des stress biotiques et abiotiques. Selon (**Nadeem et al, 2013**), certaines enzymes comme les chitinases, les lipases, les phosphatases et les protéases peuvent être produites par des rhizobactéries qui favorisent la croissance des plantes.

Les zones humides en Algérie occupent des superficies variables, principalement situées à l'Est. Ce complexe humide est constitué principalement de lacs, de marais, de chotts et de sebkhas. Les sebkhas se forment lorsque les eaux des lacs s'évaporent, laissant derrière elles des dépôts de sels. Dans le cadre de cette étude, la sebkha de Bordj Omar Idriss, situé au niveau de la wilaya de Illizi a été choisie comme site de notre étude.

Le présent travail est réalisé au sein de laboratoire pédagogique de Biotechnologie Microbienne, de Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de M'hamed Bougara de Boumerdes. Ce dernier a pour objectif l'isolement et la caractérisation biochimique et physiologique des bactéries halotolérantes isolées à partir des sols salins prélevés à partir de la sebkha de Bordj Omar Idriss ainsi que le screening des activités enzymatiques des souches bactériennes isolées.

II.1. Présentation de la région d'étude

La situation géographique de la région du Bordj Omar Driss et les facteurs écologiques qui caractérisent cette région, sont cités ci-dessous.

II.1.1. Situation géographique

La région de Bordj Omar Driss située dans le Sahara algérien, au Nord-Est et Est du grand erg oriental ($26^{\circ}33'N$; $8^{\circ}29'E$), de la wilaya d'Illizi occupe une superficie de 82406Km. Cette région est limitée au Nord par un grand erg oriental, et à l'Ouest et au Sud par un relief dunaire de Tifernanine et Hamada de Tinghert (C.E.R.U.C, 1996) (Voir figure 7).



Figure 7 : Situation géographique de la région Bordj Omar Driss.

II.1.1 Facteurs écologiques

Tels que ; le type de sol, le relief, l'hydrogéologie et les facteurs climatiques sont les composants des facteurs abiotiques de la région du Bordj Omar Driss.

II.1.1.1. Le Sol

Le sol de la région de Bordj Omar Driss présente les caractéristiques typiques des régions sahariennes. Il s'agit d'un sol pauvre en matière organique, avec une texture sableuse et une structure qui se caractérise par une perméabilité à l'eau très élevée (C.E.R.U.C, 1996).

II.1.1.2 Le Relief

D'après (C.E.R.U.C, 1996), la topographie de la région de Bordj Omar Driss se compose de deux ensembles distincts. Le premier ensemble est constitué de plateaux qui présentent une surface relativement plane, mais fortement entaillée par un réseau complexe de vallées. Le deuxième ensemble est formé de regs (plaines caillouteuses) et d'ergs (dunes de sable) composés de grès et de rochers du socle. Ces formations rocheuses donnent lieu à des pentes très abruptes et se transforment en falaises, créant ainsi diverses contraintes géographiques.

II.2. Matériel utilisés

II.2.1. Matériel non biologiques

Le matériel utilisé pour la réalisation de notre expérimentation (milieu de culture, verreries et appareillages) sont représentés au niveau de l'annexe 1.

II.2.2. Matériel biologiques

Le sol, issues de la sebkha de Tinghert de Bordj Omar Idriss, située au niveau de la wilaya d'Ilizi.

II.3. Méthodes

II.3.1. Echantillonnage

Trois échantillons de sol de la sebkha de Tinghert à Bordj Omar Driss ont été prélevés. Les prélèvements ont été réalisés en janvier 2023, collectés à partir des bords de Sebkhia à une profondeur de 10 à 15 cm, dans des flacons en verre stérile de 250ml. Les échantillons ont été ensuite transportés au laboratoire dans une glacière et conservé à 4°C jusqu'à leurs utilisation (Figure 8).

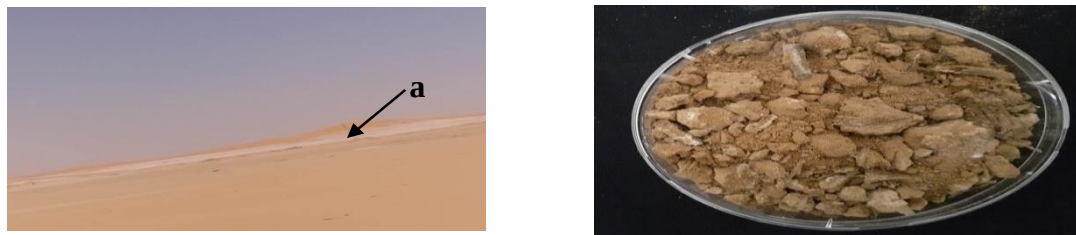


Figure 8: La Sebkha de Bordj Omar Driss : **a-** site de prélèvement **b :** sol prélevé.

II.3.2. Isolement de souches bactériennes

L'isolement des bactéries est effectué par la méthode de suspensions-dilutions selon le protocole suivant :

II.3.2.1. Préparation des dilutions

Après tamisage et broyage de sol, 10 g de chaque échantillon est pesé puis additionné de 90 ml d'eau physiologique stérile. La préparation est soumise à une agitation à l'aide d'un vortex pendant 10 minutes pour l'obtention de la suspension mère. Ensuite, des tubes à essais contenant 9ml de l'eau physiologique stérile sont préparés. Des séries de suspension / dilution au $1/10^{\text{ème}}$ sont réalisées jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-3} .

II.3.2.2. L'étalement :

100 ul de chaque dilution ont été prélevés et étalés à l'aide d'un râteau stérile dans des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive. L'opération a été répétée deux fois pour chaque dilution. Les boîtes ont été incubées pendant 24 à 48 heures à 37°C .

II.3.2.3. Purification

Les colonies ayant montrées des aspects différents sont repiqués sur le même milieu de culture. Les souches purifiées ont été codifiées, puis conservées sur des tubes inclinés contenant la gélose nutritive pour faire l'objet des tests ciblés.

II.3.3. Identification présomptive des bactéries isolées

II.3.3.1. Observation macroscopique

Elle permet de mettre en évidence l'aspect macroscopique des isolats bactériens purifiés. Cette étude consiste en une observation à l'œil nue de la taille (petite, moyenne, grande), la forme (ronde, irrégulière,...), la transparence, élévation, le type et le relief des colonies (Camille, 2007).

II.3.3.2. Observation microscopique

Elle est effectuée par l'observation microscopique et la mise en évidence de la forme, l'arrangement, et la mobilité des cellules bactériennes.

II.3.3.2.1. Observation à l'état frais

La mobilité des bactéries est étudiée par des observations microscopiques à l'état frais des cellules bactériennes. A partir d'une culture en phase de croissance, une colonie bactérienne bien isolée a été prélevée et mise dans une goutte d'eau distillé stérile entre lame et lamelle. Une observation microscopique à l'aide d'un microscope photonique est effectuée. Si on observe des mouvements des cellules bactériennes dans tous les sens ceci confirme la mobilité de la bactérie.

II.3.3.2.2. Test de Mannitol mobilité

Il s'agit d'une gélose molle conditionnée en tubes, utilisée pour étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries. L'ensemencement est effectué en réalisant une piqûre centrale jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une pipette Pasteur. La fermentation du mannitol se manifeste par un changement de couleur du milieu en jaune. Les bactéries mobiles se dispersent à partir de la ligne d'ensemencement, créant une turbidité dans le milieu, tandis que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la ligne d'ensemencement (**Gerhardt et al, 1994**).

II.3.3.2.3. Observation après coloration de Gram

Cet examen a été effectué selon la méthode classique connue, elle consiste aux étapes suivantes :

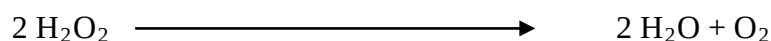
- **La préparation d'un frottis bactérien** : les bactéries isolées sont étalées à l'aide d'une anse de platine sur des lames en verre propre contenant une goutte d'eau. Ces dernières sont ensuite séchées à l'air libre à proximité d'un bec Bunsen, puis fixées par la chaleur en les passant deux ou trois fois à la flamme.
- **La coloration** : les frottis préparés sont colorés pendant 1 minute au cristal violet, qui est un colorant basique, ils sont ensuite, rincés rapidement par une solution de *lugol* (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium), qui agit comme un mordant, en augmentant les interactions entre le colorant et la cellule pour que cette dernière soit contrastée.
- Sans rincer et en inclinant les lames à 45°, les frottis sont ensuite décolorés par un lavage avec un mélange d'éthanol et d'acétone (1 à 3 secondes).
- Cette décoloration est arrêtée rapidement par un lavage excessif à l'eau du robinet.

- La dernière étape consiste à une contre-coloration, où les frottis sont soumis pendant 30 secondes à la fuchsine basique diluée.
- Après un bref rinçage, les frottis sont séchés par le papier Buvar et examinés par microscope photonique jusqu'à l'objectif à immersion (grossissement X100) (**Camille, 2007**).
- La couleur violette due au cristal violet est l'aspect caractéristique des bactéries à coloration Gram positive, alors que les bactéries Gram négative se colorent en rose par la fuchsine (**Tortora et al, 2003**).

II.3.3.2.4. Etudes des enzymes respiratoires

II.3.3.2.4.1. Recherche de la catalase

Elle empêche l'accumulation de l'eau oxygénée (H_2O_2) dans la cellule bactérienne dont l'action serait létale, cette enzyme catalyse la réaction suivante :



La présence de l'enzyme catalase se traduit par un dégagement immédiat de bulles gazeuses. (**Health Protection Agency, 2011**) (**Figure 9**)

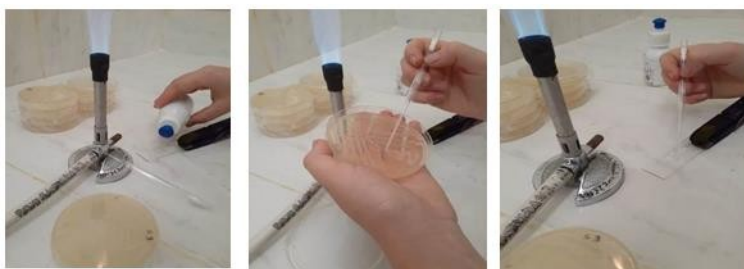


Figure 9 : les étapes de la recherche de la catalase.

II.3.3.2.4.2. Recherche de l'oxydase

Il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase, une enzyme clé de la chaîne respiratoire qui facilite le transfert des électrons vers l'oxygène ou d'autres agents oxydants minéraux. Le procédé utilisé consiste à déposer une colonie de la souche sur un disque préalablement imprégné d'un réactif appelé oxalate de N-diméthyle paraphénylène-diamine. La présence de l'enzyme se manifeste par l'observation d'une couleur violette noirâtre sur le disque. Cette modification visuelle indique la présence de l'activité de l'enzyme recherchée (**Figure 10**).



Figure 10 : les étapes de la recherche de l'oxydase

II.3.4. Mise en évidence des activités enzymatiques extracellulaires

II.3.4.1 Production d'ammoniac NH_3

Le test qualitatif décrit est basé sur la méthode de Capuccino et Sherman (1992). Il implique l'inoculation de 100 μl de la suspension bactérienne dans 10 ml d'eau peptonée. Après une incubation à 30°C pendant 48 heures, 0,25 ml du réactif de Nessler est ajouté à chaque tube d'eau peptonée. La formation d'une couleur orange indique la production de NH_3 (ammoniac) par la nitrégénase. Ce changement de couleur est un indicateur de la capacité de la souche bactérienne à métaboliser les composés azotés en produisant de l'ammoniac (**Figure 11**).

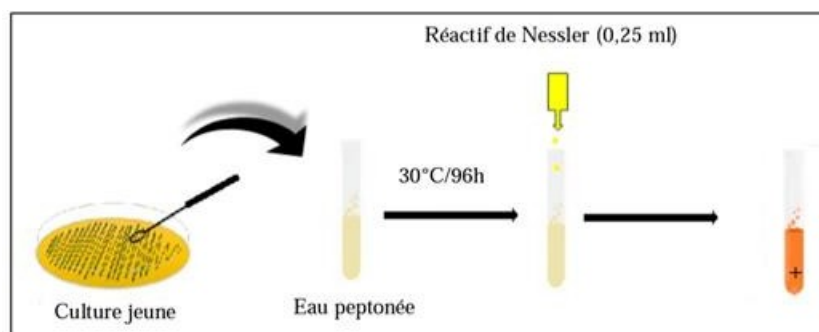


Figure 11 : Recherche de production de NH_3

II.3.4.2. La fixation d'azote

L'évaluation de la capacité de fixation de l'azote par les isolats bactériens testés a été déterminée sur un milieu dépourvu d'azote (Annexe 2). Ce dernier a été inoculé par une colonie bactérienne prélevée à partir des cultures jeunes de 24h au centre de la boîte de Pétri. Les isolats qui sont fixateurs d'azote par certaines enzymes montrent une croissance ordinaire autour de spot inoculé après 24 à 48 heures d'incubation à 37°C (**Zhang et al, 2017**).

II.3.4.3. La recherche de l'amylase

Selon la méthode **d'Amoozegar et al, (2003)**, Pour déterminer qualitativement la présence de l'activité amylolytique, on utilise le milieu GN additionné d'une solution d'amidon soluble à 1%. Après l'ajout de cette solution, le milieu de culture étaitensemencé par une culture bactérienne jeune. Une incubation de 48h à 37°C est préconisée. On procède à la lecture en ajoutant du lugol. Ce dernier interagit avec l'amidon pour former un complexe qui donne une couleur bleue violette caractéristique. L'absence de cette couleur où l'apparition d'un halo clair autour de la colonie indique la présence d'une activité amylolytique, c'est-à-dire la capacité de l'enzyme à dégrader l'amidon en produits plus simples (**Ait kaki, 2017**).

II.3.4.4. Cellulase

Dans cette étude, l'activité d'hydrolyse de la cellulose a été testée dans un milieu de culture contenant 0,5% (p/v) de carboxyméthylcellulose (CMC) (**Benkahoul et al, 2017**). Après avoirensemencé les boîtes de culture et les avoir incubées, elles ont été inoculées pendant 15 minutes avec une solution de rouge Congo, puis lavées avec une solution de chlorure de sodium à 1 M. L'hydrolyse de la cellulose se manifeste par des zones non colorées (**Korish, 2003**).

II.3.4.5. Recherche des pectinases

Le test pectinase permet d'identifier l'activité pectinolytique d'une bactérie c'est-à-dire sa capacité à dégrader la pectine présente dans le milieu de culture. La recherche de l'activité pectinolytique est effectuée sur le milieu pectine Hildebrand (pH).

- Inoculer le milieu PH par points en déposant des amas de bactéries à identifier à la surface de milieu coulé préalablement sur des boites de Pétri stérile.
- Incuber à 30 °C pendant 48 heures.

Une réaction **positive** se traduit par la présence d'une dépression du milieu entourant le point d'inoculation. Par contre l'absence de dépression indique une réaction négative (**Benkahoul et al, 2017**).

II.3.4.5. Recherche des lipases

La recherche des deux activités est réalisée sur un milieu de culture décrit par Sierra (1957). Après ensemencement, les boîtes de culture été incubées à une température de 37°C pendant 48 heures. La présence d'une activité est indiquée par l'apparition d'un halo opaque autour des colonies bactériennes.

II.3.4.6. Recherche des protéases

La présence des protéases est détectée sur un milieu de culture contenant du lait écrémé et de la gélose nutritive. Une solution de lait écrémé à 10% est ajoutée au milieu de culture. Les boîtes de cultureensemencées sont incubées à une température de 30°C pendant 48 heures. L'apparition d'un halo transparent autour des colonies bactériennes indique la présence d'une activité hydrolytique des protéases (**Bach et Munch, 2000**).

II.3.4.7. Recherche des Glucanases

Pour la production des glucanases par les isolats de bactéries testées, le milieu additionné de la farine d'orge comme source de carbone (**Teather et Wood, 1982**). Après inoculation des isolats bactériens au centre de la boîte de Pétri et une incubation à 30°C pendant 2 jours, la révélation l'enzyme a été réalisée par l'ajout de 5 ml d'une solution de rouge Congo. L'apparition d'une zone claire autour des colonies indique la production des glucanases.

II.3.5. Etude des paramètres physiologiques

L'objectif de cette étude est de déterminer l'impact de plusieurs facteurs biologiques, tels que la température, le pH et la tolérance aux sels sur le développement et la survie des bactéries isolées.

II.3.5.1. Etude de l'effet de température

La croissance et la survie des souches bactériennes isolées sont examinées dans des tubes à essais contenant 3,5 ml de bouillon nutritif. Après incubation de 2 jours à 37°C dans incubateur agitateur, 10µl de chaque suspension ont étéensemencé dans des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive. Les boîtes ont été incubées à différentes températures à savoir le 25, 35, 45, 55 et 65 °C. L'apparition de colonies indique la tolérance des bactéries à la température testée.

II.3.5.2. Etude de l'effet du pH

Différents milieux de cultures dont les pH varient entre 3 et 11 ont été préparés en utilisant des tampons appropriés (annexe 4). Les pH de ces milieux ont été vérifiés et ajustés après autoclavage et juste avant l'incubation des cultures. Les tubes inoculés sont incubés à température ambiante sous agitation dans un incubateur-agitateur. La survie et la croissance des isolats bactériens ont été évaluées après 48 h par lecture de la DO à 540 nm.

II.2.5.3. Etude de l'effet des sels (NaCl)

La résistance osmotique des souches bactériennes isolées, a été évaluée sur le bouillon nutritif additionné de 4 concentrations différentes de NaCl à savoir 2,5 ; 5 ; 7,5 et 10 % (w/v). Il faut noter que le pH du milieu est ajusté à 6,5. Les 9 souches sont mises en culture dans des tubes contenant 4,5 ml du bouillon nutritif additionné séparément par le NaCl aux concentrations précitées à raison de 4 tubes par isolat et par concentration. Après 48 h d'incubation, la DO à 540 nm de chaque tube est mesurée.

III.1. Isolement et caractérisation des souches isolées

Au total, 11 souches bactériennes ont été isolées à partir des trois types de sol échantillonnés, ces dernières ont été codifiées de S1 au S11. Nous avons remarqué que la totalité des souches possèdent une croissance rapide, envahissant le milieu de culture par apparition de colonies bien distinctes et après 24h d'incubation à 37°C.

III.1.1. Caractérisation macroscopique

Après ensemencement des souches sur le milieu de culture GN, les colonies apparaissent après 24 heures d'incubation à 37°C circulaires et convexes à contour régulier, de surface lisse et gluante et de couleur beige claire, leur diamètre est d'environ de 2 à 3 mm pour la plus part (**Figure 12**).

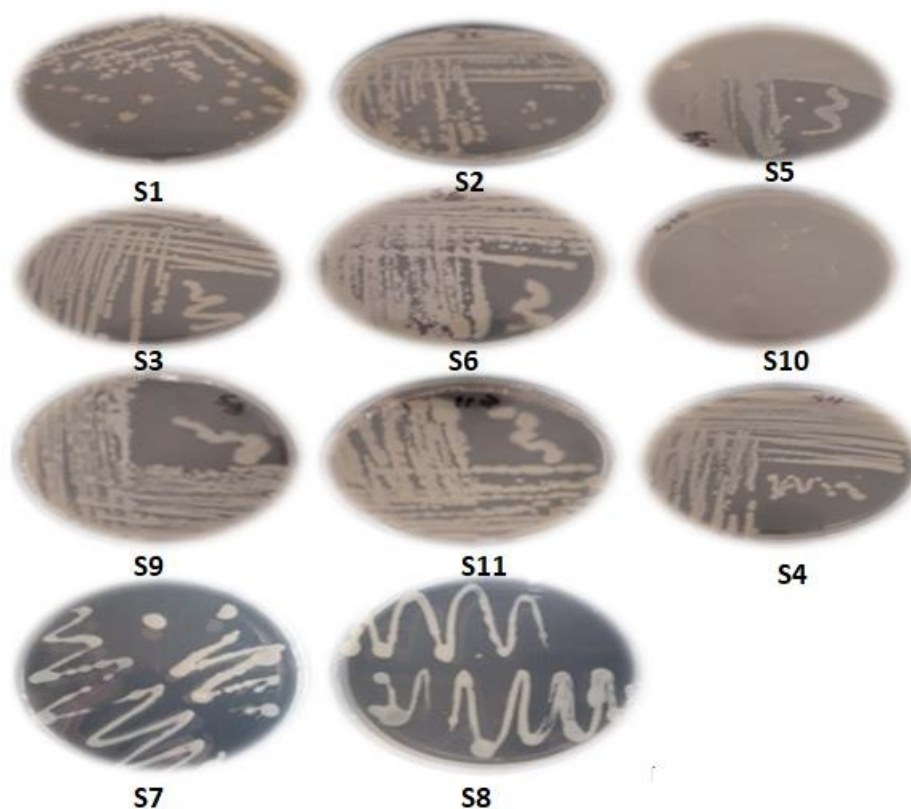


Figure 12 : Aspects macroscopiques des souches bactériennes isolées sur milieu solide gélose nutritif après 24h d'incubation.

III.1.2. Caractérisation microscopique

Afin de mieux caractériser les souches isolées, une observation microscopique à l'état frais a été réalisée pour étudier la forme et la mobilité de ces micro-organismes. Les résultats obtenus ont révélé que la plupart des souches se présentent sous forme de bâtonnets, à l'exception des isolats S7 et S8 qui a une forme en Cocci. Nous avons constaté que les souches S1, S2, S5, S9 et S10 étaient mobiles, présentant des mouvements dans tous les sens après observation sous microscope optique, tandis que les autres souches ont été immobiles. La coloration de Gram a indiqué que toutes les souches sont de Gram positif. Les souches S2 et S6 sont des bacilles sporulés, possédant des spores terminales (**Figure 13**).

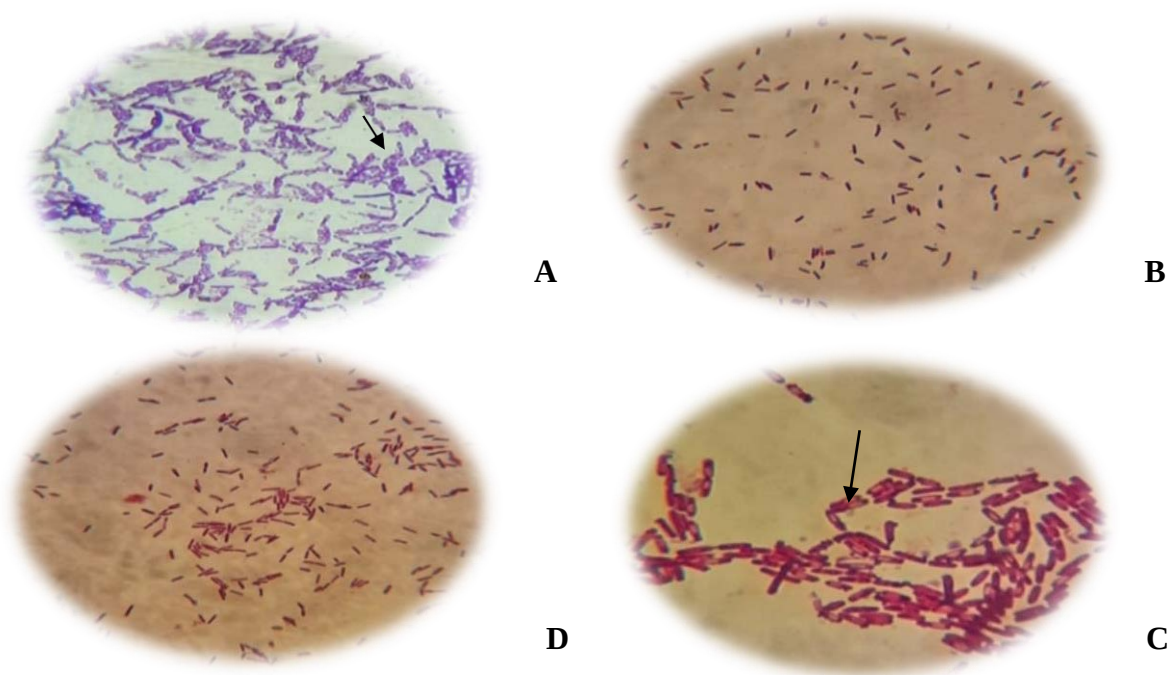


Figure 13: Observation microscopique des souches cultivées sur milieu GN après coloration de Gram (Observation par microscope optique G x100 à immersion). Les flèches montrent les cellules bactériennes sporulées.

A. Souche 02

B. souche 04

C. souche 05

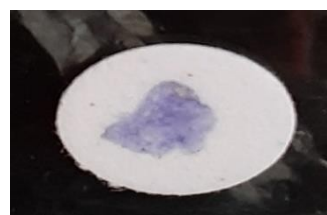
D. souche 06

III.1.3. Résultats des tests d'enzymes respiratoires ; catalase et oxydase

Les tests oxydase et catalase sont des tests primordiaux pour la détermination de type respiratoire chez les bactéries. Les figures ci-dessous montrent des résultats positifs des tests catalase et oxydase respectivement (**Figure 14**),



A. Résultat positif du test de la catalase



B. Résultat positif du test de l'oxydase

Figure 14 : Résultats positifs (A, B) de la recherche des enzymes respiratoires.

III.1.4. Mannitol mobilité

Le résultat de ce test confirme la mobilité des souches S1, S2, S5, S9 et S10. Nous avons constaté que toutes les souches fermentent le mannitol. Ce milieu de culture se caractérise par une faible teneur en agar, ce qui le rend semi-mou et permet le déplacement des bactéries autour de la piqûre centrale d'ensemencement. De plus, la présence d'un indicateur de pH, le rouge de phénol, permet de détecter l'utilisation du mannitol. La fermentation du mannitol entraîne une acidification du milieu, ce qui se manifeste par un changement de la couleur de l'indicateur de pH vers le jaune (figure 15).



Figure 15: Résultat de la culture des souches (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S9, S10, S11) sur le milieu Mannitol-mobilité après 24 heures d'incubation à 30°C.

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus des différents tests effectués;

Tableau 4 : les résultats des tests physiologiques et biochimique effectués.

Souches	Forme	Gram	Catalase	Oxydase	Mannitol mobilité
S1	Bacille	+	-	-	+
S2	Bacille	+	+	+	+
S3	Bacille	+	-	+	-
S4	Bacille	+	+	+	-
S5	Bacille	+	+	+	+
S6	Bacille	+	+	+	-
S7	Cocci	+	+	+	-
S8	Cocci	+	-	+	-
S9	Bacille	+	+	+	+
S10	Bacille	+	-	+	-
S11	Bacille	+	-	+	+

+ : indique un résultat positif ; - : indique un résultat négatif.

III.2. Résultats des tests enzymatiques

Pour la recherche de l'activité enzymatique le travail a été réalisé uniquement sur les neuf souches qui ont présenté une forme bacillaire avec un GRAM positif à savoir S1, S2, S3, S4, S5, S6, S9, S10 et S11.

III.2.1. Amylase

Dans ce travail, les 9 souches testées se sont révélées productrices de l'amylase. A partir de nos résultats on peut conclure que nos souches sont capables de dégrader l'amidon en exprimant une forte production d'amylase. La synthèse des enzymes amylasiques par les bactéries du sol permet une dégradation de la matière organique dans la nature en fournissant des éléments minéraux que les plantes exigent pour leur croissance. **(Shonkor et al, 2011)** ont montré que les espèces du genre *Bacillus* sont capables de produire des enzymes extracellulaires (amylases, chitinases ...etc), et Selon **(Bertoldo et Antranikian, 2001 ; Rao et Satyanarayana, 2007)**, de nombreuses espèces du genre *Bacillus* sont connues par leurs capacités à produire des α -amylase qui possède un grand intérêt biotechnologique surtout dans le domaine industriel de la production des détergent. Les figures ci-dessous expriment les différents résultats obtenus **(Figure 16)**

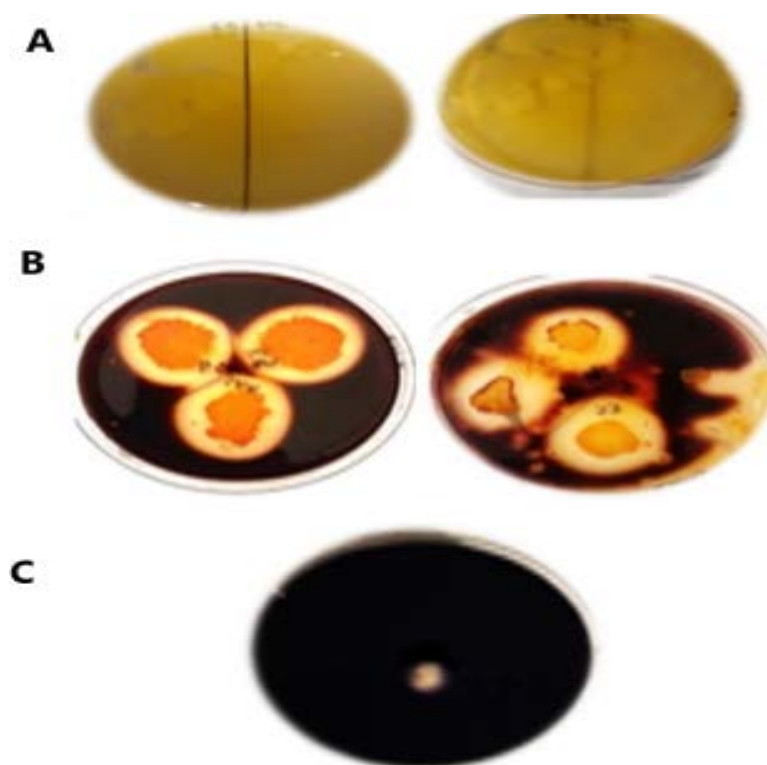


Figure 16: Résultats de la recherche de l'activité amylasique des souches bactériennes isolées sur le milieu amylose après 48 heures d'incubation à 30°C. A : dégradation totale de l'amidon ; B : dégradation partielle ; C : Témoin (pas de dégradation).

III.2.2. Cellulase

Pendant de nombreuses années, les chercheurs se sont concentrés sur la caractérisation et l'amélioration des cellulases produites par les bactéries dégradant la cellulose (**Otajevwo et Aluyi, 2011**). Les résultats obtenus montrent que l'ensemble des souches bactériennes testées, présentent une activité cellulasique, mise en évidence par des zones d'hydrolyse claires autour des colonies (**Figure 17**).

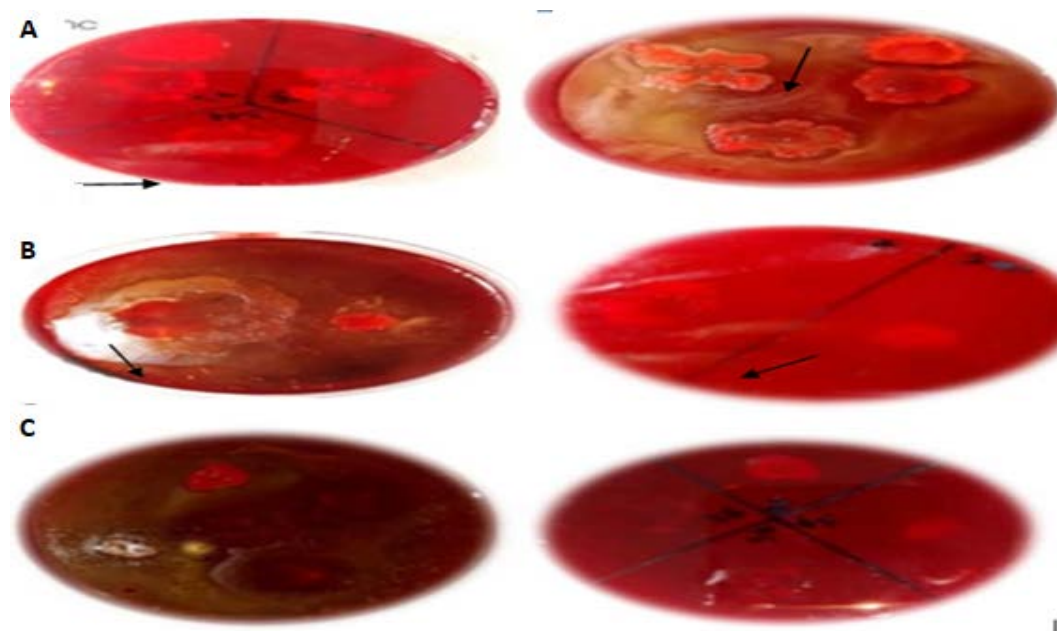


Figure 17 : Résultats de la recherche de l'activité cellulolytique des souches (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S9, S10, S11) sur le milieu CMC après 72 heures d'incubation à 30°C. A : indique une activité cellulolytique importante ; B : indique une activité positive ; C : indique un résultat négatif. Les flèches montrent les halos d'hydrolyse autour des colonies bactériennes.

Cette observation pourrait être expliquée par le type de Gram des isolats obtenus, car selon **Lu et al, (2005)**, environ 80 % des bactéries cellulolytiques isolées jusqu'à présent sont Gram positifs (Schwarz, 2001). De plus, d'après les travaux de **Maki et al, (2011)**, plusieurs souches de *Bacillus* ont été identifiées comme étant capables de produire des cellulases qui dégradent les fibres de cellulose en sucres plus simples, utilisés comme source de carbone et d'énergie. En revanche, nous avons observé que les autres souches (S3, S4 et S10) ne présentent aucune activité cellulolytique.

III.2.3. Pectinases

Les résultats obtenus montrent qu'à l'exception des isolats S4 et S9 qui ont démontré des réactions positives par l'apparition des colonies sur le milieu à base de pectine, toutes les autres souches ont donné des résultats négatifs ce qui signifie que nos souches sont incapables de dégrader la pectine. L'activité pectinolytique est très limitée, et tous les isolats ne

produisent pas la pectinase. La pectine est une substance naturelle présente dans les plantes qui contribue à la texture et à la fermeté des fruits et légumes. Le genre bactérien *Bacillus* comprend plusieurs espèces, parmi lesquelles certaines sont connues pour leur capacité à produire des enzymes telles que la pectinase. Une étude menée par Delgado et *al*, (2014) a réussi à isoler des pectinases à partir de bactéries halophiles appartenant aux espèces *Bacillus pumilus* (CP-01), *Bacillus atrophaeus* (PN-01) et *Bacillus atrophaeus* (SY-01) et cela contredit nos résultats. Il est très fort probable que les isolats S5 et S6 appartiennent à l'une des espèces de *Bacillus* précité connues pas leurs pouvoir producteur de pectinase (**Figure 18**).

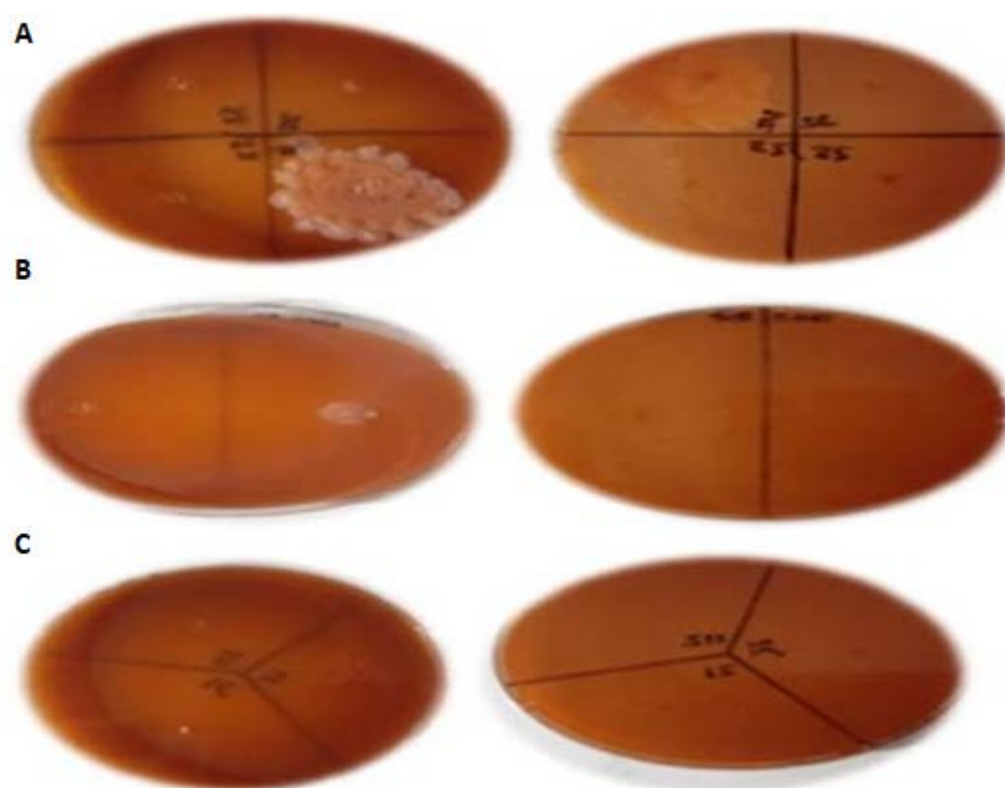


Figure 18: Résultats de la recherche de l'activité de pectinolytique des souches bactériennes sélectionnées sur le milieu pectine après 48 heures d'incubation à 37°C. A : activité importante observée chez la souche S4 ; B : une faible activité observé chez la souche S9 ; C : Aucune activité observée.

III.2.4 Résultats de la recherche des lipases

III.2.4.1. Sur Tween 80

L'enzyme lipase, présente chez de nombreux organismes, notamment certaines souches de *Bacillus*, jouent un rôle crucial dans la dégradation des lipides, conduisant à la libération d'acides gras et de glycérol.

Des souches de *Bacillus* ont été cultivées sur un milieu contenant du tween 80 (un substrat lipidique) en tant que source de nutriment. Si la bactérie produit une lipase fonctionnelle, elle sera capable de dégrader le tween 80 en acides gras libres. L'activité lipasique peut ensuite être évaluée en observant la formation d'une zone d'opacité ou d'un halo autour de la colonie bactérienne, ce qui indique la libération d'acides gras (S1, S2, S3, S4, S5, S9, S11), tandis que l'absence de ce halo indique l'absence de libération d'acides gras chez les autres souches. Selon les études de **Sharma et al, (2001)**, **Gupta (2004)** et **Fickers et al, (2007)**, les lipases sont couramment présentes chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont produites aussi bien par les bactéries Gram +, comme *Bacillus*, que par les bactéries Gram⁻. **D'après Ji et al, (2014)**, les bactéries du genre *Bacillus* produisent des estérases et des lipases. En outre, **Honda et al, (2002)** et **Ji et al, (2014)** ont démontré une activité estérasique élevée chez ces bactéries. La figure 19 illustre les résultats obtenus.

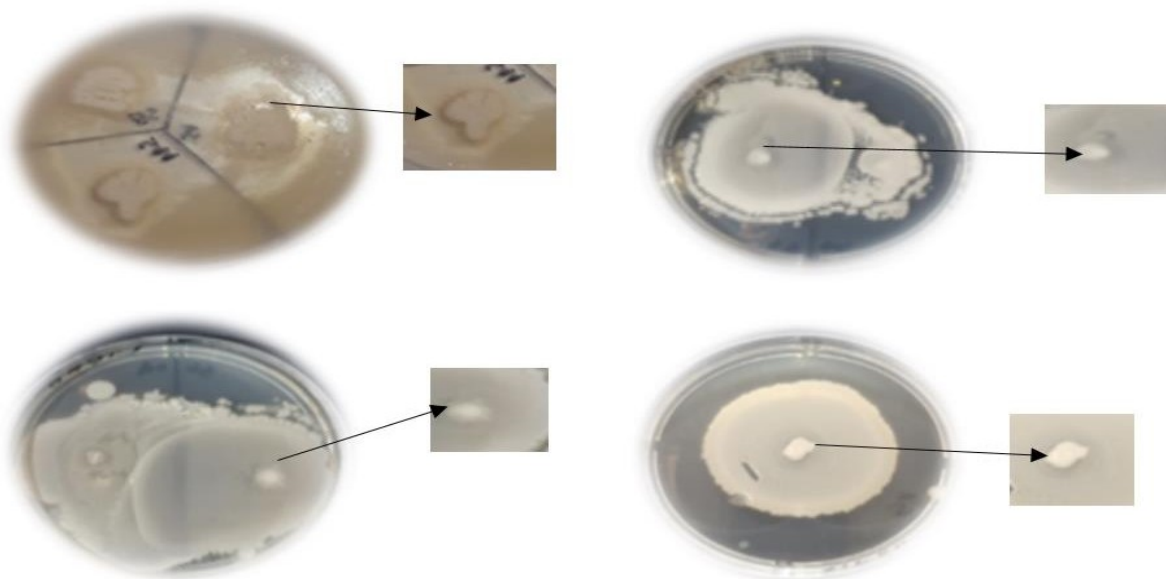


Figure 19: Résultats de la recherche de l'activité lipasique des souches (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S9, S10, S11) sur le milieu tween 80 après 48 heures d'incubation à 37°C. Les flèches montrent le halo opaque autour des colonies.

III.2.4.2. Sur Tween 20

Les résultats de la mise en évidence de l'activité lipasique sur les milieux solides a base de Tween 20 sont illustrés dans la figure 20. Les colonies des microorganismes producteurs de lipases apparaissent entourées d'un halo opaque accompagné par la formation des cristaux de sel de calcium.

D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué que les souches testées ont montrées des pouvoirs d'hydrolysées le Tween 20 plus important que le Tween 80.

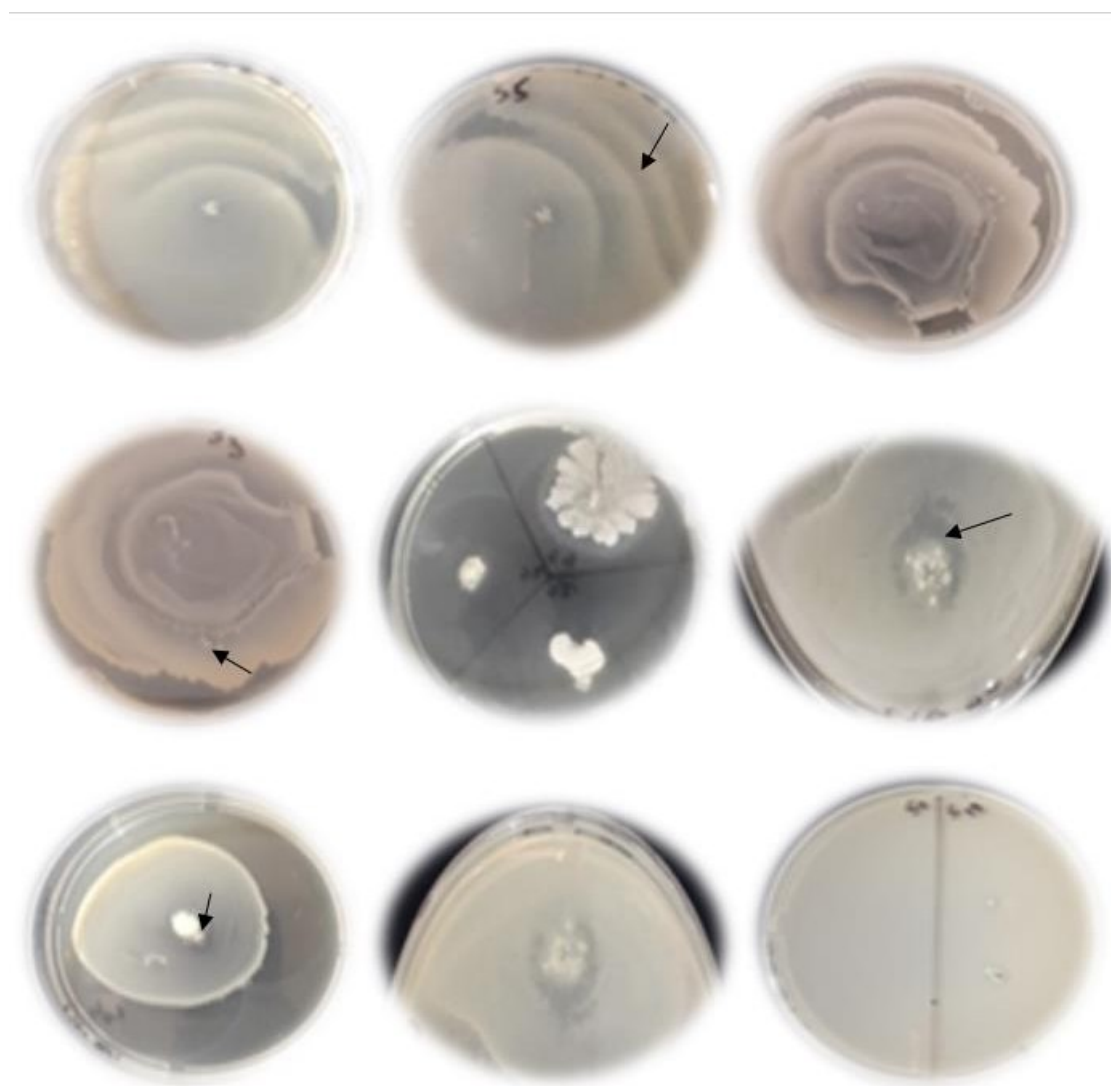


Figure 20 : Résultats de la recherche de l'activité lipasique sur le milieu à base de Tween 20 des souches (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S9, S10, S11) après 48 heures d'incubation à 37°C. Les flèches montrent le halo opaque autour des colonies et le point de dépôt des sels.

III.2.5. Résultats de la production de protéase

D'après **Kuban et al, (2010)**, plusieurs souches microbiennes, telles que *Bacillus*, sont connues pour produire des protéases. Les protéases d'origine microbienne sont parmi les enzymes les plus sécrétées, comme le souligne **Ningthoujam et al, (2009)**. Les résultats obtenus montrent que 8 isolats sur les 9 souches testées, notamment les isolats S1, S5 et S11, ont présenté une activité protéasique importante. La dégradation des protéines par les protéases microbiennes joue un rôle essentiel dans le cycle de l'azote, en rendant les nutriments disponibles pour les plantes et les micro-organismes, comme l'ont mis en évidence Petit et Jobin (2005) (Voir figure 21).

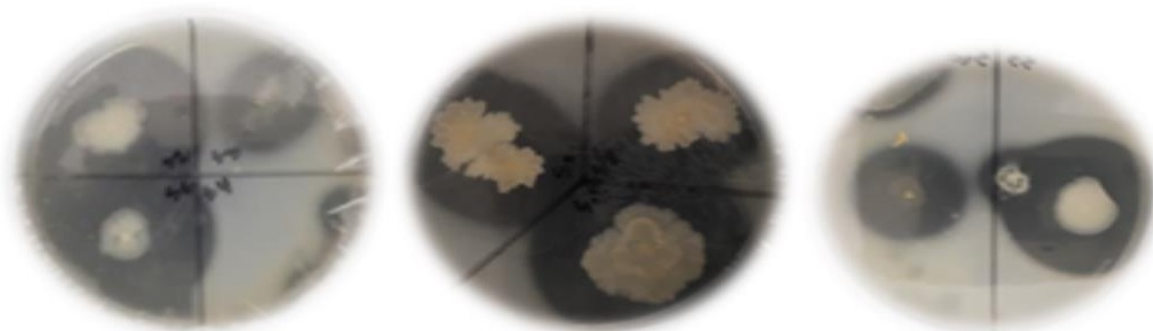


Figure 21 : Résultats de la recherche de l'activité protéasique des souches (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S9, S10, s11) sur la protéase après 48 heures d'incubation à 30°C.

III.2.6. Glucanase

Après 48 heures d'incubation des neuf isolats bactériens, nous avons observé la formation de zones claires ou transparentes autour des coloniesensemencés sur le milieu de culture contenant le substrat glucanique, pour l'ensemble des souches à l'exception des isolats S4 et S10. Ce halo est généralement considéré comme un indicateur positif de l'activité glucanase. L'activité de glucanase chez les *Bacillus* revêt différentes implications biologiques. Tout d'abord, ces enzymes jouent un rôle crucial dans la dégradation des glucanes présents dans l'environnement. Les *Bacillus* peuvent se nourrir de ces glucanes pour obtenir de l'énergie et des nutriments. Les glucanases leur permettent de décomposer ces polymères complexes en unités de glucose plus simples, qui peuvent ensuite être métabolisées. Certaines souches de *Bacillus* sont utilisées en agriculture comme agents de biocontrôle pour lutter contre les pathogènes des plantes. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure ci-dessous ;

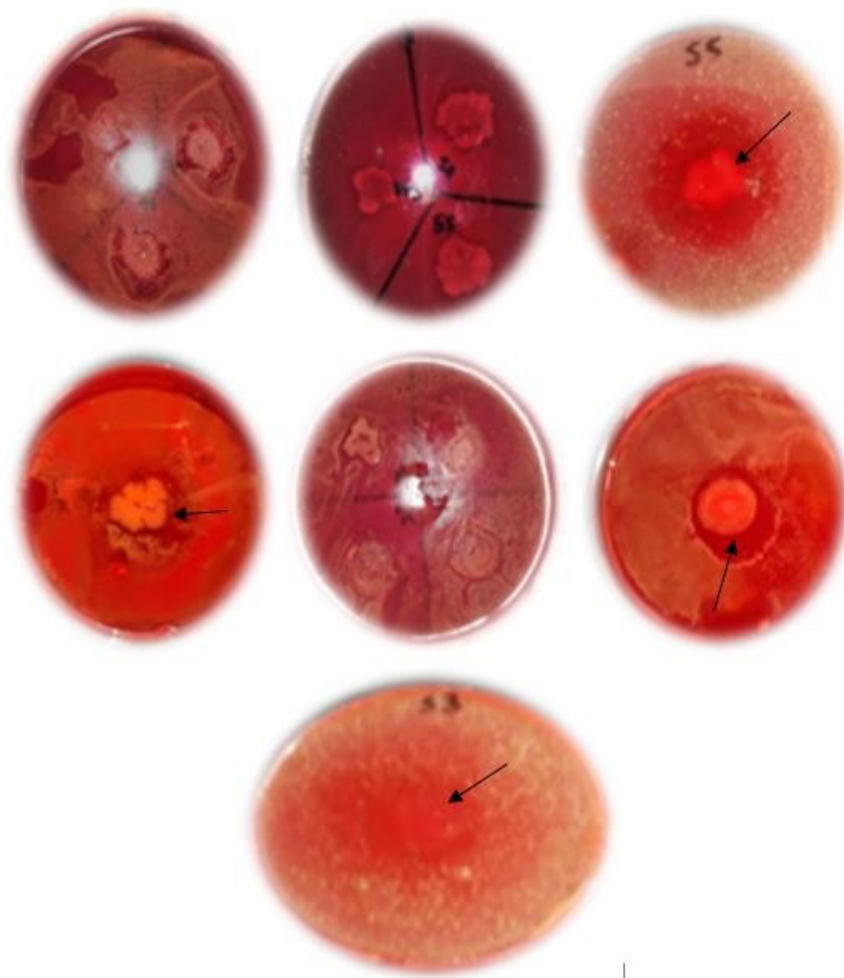


Figure 22 : Résultats de la recherche de l'activité glucanase des souches bactériennes isolées (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S9, S10, S11) sur le milieu glucane après 48 heures d'incubation à 37°C. Les flèches montrent les zones d'hydrolyse.

III.2.7. Résultats de la production de l'ammoniac NH_3

Les résultats obtenus montrent que la production de NH_3 est présente chez la majorité de nos isolats (66,67%), soit 6 sur 9 souches, à des niveaux plus ou moins variables selon l'intensité de virage de la couleur de milieu inoculé par les différentes souches bactériennes testées après l'ajout du réactif de Nessler. Selon **Ahmed et al, (2008)**, la production d'ammoniac est l'un des traits qui favorisent indirectement la croissance des plantes. Certains *Bacillus* sont capables de dégrader des substrats azotés complexes, tels que les protéines, en ammoniac, qui peut ensuite être utilisé comme source d'azote pour la synthèse de biomasse.

La production d'ammoniac par les bactéries joue également un rôle essentiel dans la lutte contre les champignons phytopathogènes, comme l'ont souligné **Kavitha et al. (2013)**. C'est considéré comme une caractéristique importante des rhizobactéries qui améliorent indirectement la croissance des plantes (**Voir figure 23**).



Figure 23 : Résultat de production de l'ammoniac par les souches bactériennes testées après 48 heures d'incubation.

III.2.8. Fixation de l'azote (AFM)

La capacité de fixation de l'azote moléculaire est testée sur un milieu solide dépourvu d'azote. Le milieu estensemencé par des cultures bactériennes âgées de 24h, puis incubé à une température de 37°C pendant 48 heures. Toute croissance observée sur ce milieu indique la capacité des bactéries à fixer l'azote moléculaire.

Les résultats obtenus démontrent que toutes les souches bactériennes étaient capables de fixer l'azote atmosphérique à l'exception de la souche S1, ceci est traduit par une croissance sur le milieu de culture utilisé au niveau du point d'ensemencement. Il est important de noter que pour la souche S1 aucune croissance bactérienne n'a été observée donc cet isolat était incapable de fixer l'azote atmosphérique. Les bactéries diazotrophes fournissent un avantage aux plantes en fixant l'azote atmosphérique en échange du carbone libéré par les exsudats racinaires (**Voir figure 24**). Tout organisme a besoin de l'azote pour la synthèse des protéines, sauf que la forme présente dans la nature est l'azote atmosphérique le N_2 , inaccessible pour la plupart des organismes (**Souza et al, 2015**). La fixation de cette forme d'azote par les bactéries et les archaees contribue à la stimulation de la croissance des plantes (Dixon et Kahn, 2004). *B. velezensis* OEE1 est capable de croître sur le milieu AFM fixant ainsi l'azote atmosphérique pour échapper à cette carence. En effet, les bactéries appartenant aux genres *Burkholderia*, *Pantoea*, *Bacillus* et *Klebsiella* sont des endophytes fixateurs d'azote atmosphérique (**Ikeda et al, 2013**).

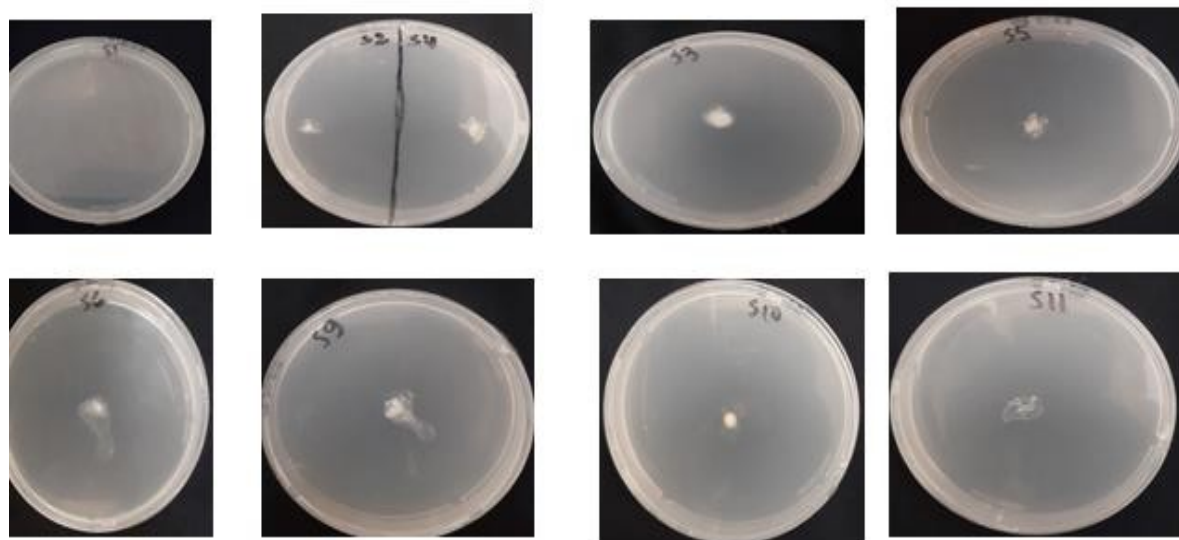


Figure 24 : Résultats de la recherche de l'activité du AFM des souches (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S9, S10, S11) sur le milieu AFM après 48 heures d'incubation à 37°C.

Le Tableau ci-dessous résume l'étude l'endophytisme des différentes souches bactériennes testées. Les enzymes testées sont des facteurs favorisent grandement la détection et l'identification de la plante hôte afin d'assurer une colonisation appropriée des racines et la formation d'un environnement adéquat permettant la prolifération de *Bacillus* sp.

Dans les tissus internes de la plante. L'étude in vitro sur des milieux de culture spécifiques et la mise en évidence des activités enzymatiques, a révélé que nos souches comprennent divers enzymes qui hydrolysent les celluloses, les pectines et l'amidon disponibles dans la rhizosphère par production respectivement des cellulases, des pectinases et de l'amylase (Figure 16, 17 et 18). Une partie de ce répertoire enzymatique peut être utilisée par les bactéries testées pour traiter les surfaces des plantes afin de permettre la colonisation au niveau de la rhizosphère. Les glycosides hydrolases permettent la dégradation des composants hémicellulosiques présents dans les parois cellulaires des plantes.

D'autres enzymes tels que la pectinase et l'amylase peuvent également participer à la dégradation des tissus végétaux (Niazi et al, 2014). Ces enzymes hydrolytiques sont indispensables pour la colonisation du milieu inter et intra cellulaire des plantes et pour renforcer par conséquent quelques propriétés métaboliques telles que l'amélioration de la croissance et le contrôle des agressions biotique et abiotique (Verma et al, 2001 ; El Deeb et al, 2012). La production de la glucanase, la protéase et les lipases a été évaluée qualitativement sur des milieux gélosés additionnés respectivement de la farine d'orge, du lait

écrémé et de Tween 80 et 20 respectivement (**Figure 19, 20, 21 et 22**). Ces deux derniers ont servi à la détection de l'activité protéolytique et lipolytique.

Après incubation des boîtes dans les conditions appropriées, des zones claires d'hydrolyse autour des colonies, indiquant la présence des enzymes lytiques ont été observées. En effet, la α -1,3-glucane avec la chitine sont les principaux polysaccharides formant la paroi cellulaire fongique ce qui rend des chitinases et des β -1,3-glucanases les enzymes clés dans la lutte contre les champignons phytopathogènes (**Kim et Chung, 2004**).

Cependant, d'autres CWDE y compris les protéases, peuvent également être impliqués dans ce mécanisme étant donné que les protéines présentent des polymères mineurs de la paroi cellulaire (**Ait-Lahsen et al, 2001**). La stimulation de la croissance des plantes est un caractère très recherché chez les BCAs. Les résultats de la fixation d'azote et de la production de l' NH_3 sont illustrés sur les figures 23 et 24. Selon **Guemori-Athmani et al, (2000)**, cette capacité, mesurée par l'activité de la nitrogénase, qui existe chez certaines souches de *Bacillus* isolées du sol algérien. La fixation de l'azote est considérée comme une propriété importante des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) qui influence directement la croissance des plantes. C'est l'un des mécanismes clés par lesquels la plante bénéficie de l'association avec ces micro-organismes.

Tableau 5 : Résultats des différentes activités enzymatiques testés sur les souches bactériennes isolées à partir de la Sabkha de Bordj Omar Idris.

Souches	Amylase	Cellulase	Pectinase	Lipase 80	Lipase 20	Protéase	Glucanase	AFM	Production de NH_3
S1	+++	+	-	++	-	+++	++	-	++
S2	+++	++	-	++	+	+++	++	+	-
S3	+++	-	-	++	++	++	+	+	+++
S4	++	-	+++	++	+++	-	-	+	-
S5	+++	+++	-	+	+++	+++	++	+	++
S6	+++	++	-	-	+	+++	+	+	+++
S9	++	+	+	+	++	+++	++	+	++
S10	+	++	-	-	++	++	-	+	-
S11	+++	++	-	+	-	+++	++	+	+++

- : résultats négatifs ; + : résultats positifs ; ++ : résultats importants ; +++ : très importants.

Dans ce tableau il apparaît clairement que les souches isolées possèdent un pouvoir enzymatique très développé et peuvent dégrader une gamme très diversifiée de métabolite, le point fort de notre étude.

III.3. Résultats des tests physiologiques

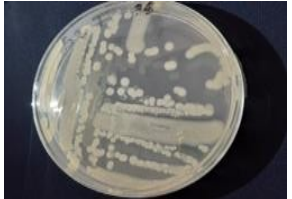
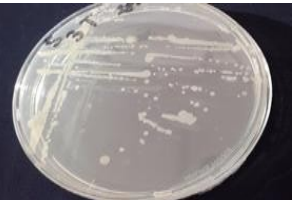
Les résultats de l'effet des différents facteurs abiotiques sur la croissance et le développement des souches bactériennes étudiées sont présentés ci-dessous; (Les figures des concentrations bactériennes sont présentés dans l'annexe 4).

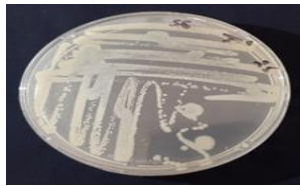
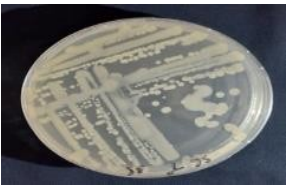
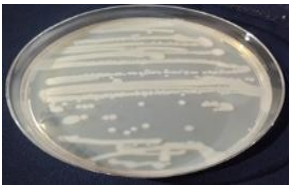
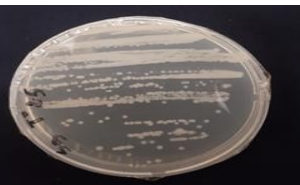
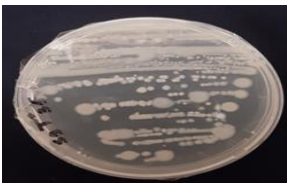
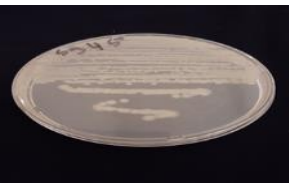
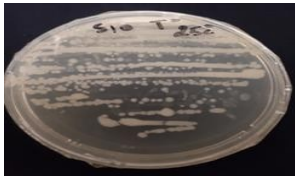
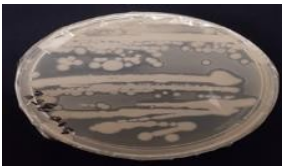
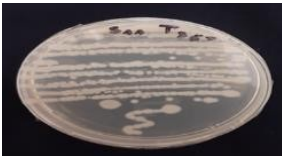
III.3.1. Résultats de l'effet de température

Les résultats de l'effet de la température sur la croissance des différentes souches bactériennes isolées sont illustrés dans le tableau 6 et la figure 25. De manière générale, ces résultats montrent que pour les souches testées, l'optimum de croissance se situe entre 25 et 35°C. Ensuite, on note que cette multiplication bactérienne diminue de façon graduelle à partir de 35°C. Ces résultats prouvent que les souches testées tolèrent bien les moyennes températures se sont des mésophiles.

Selon l'étude de Vidyalakshmi et *al*, (2009), la température de croissance joue un rôle crucial non seulement dans la cinétique de croissance des bactéries, mais également dans la cinétique de production des enzymes. Lorsque la température augmente, elle peut entraîner la dénaturation et l'inactivation de l'enzyme (Demirkan et *al*, 2017).

Tableau 6 : Résultats de la croissance des souches bactériennes testées après 24 h d'incubation aux différentes températures.

T° Souche	25°C	35°C	45°C
S1			
S2			
S3			

S4			
S5			
S6			
S9			
S10			
S11			

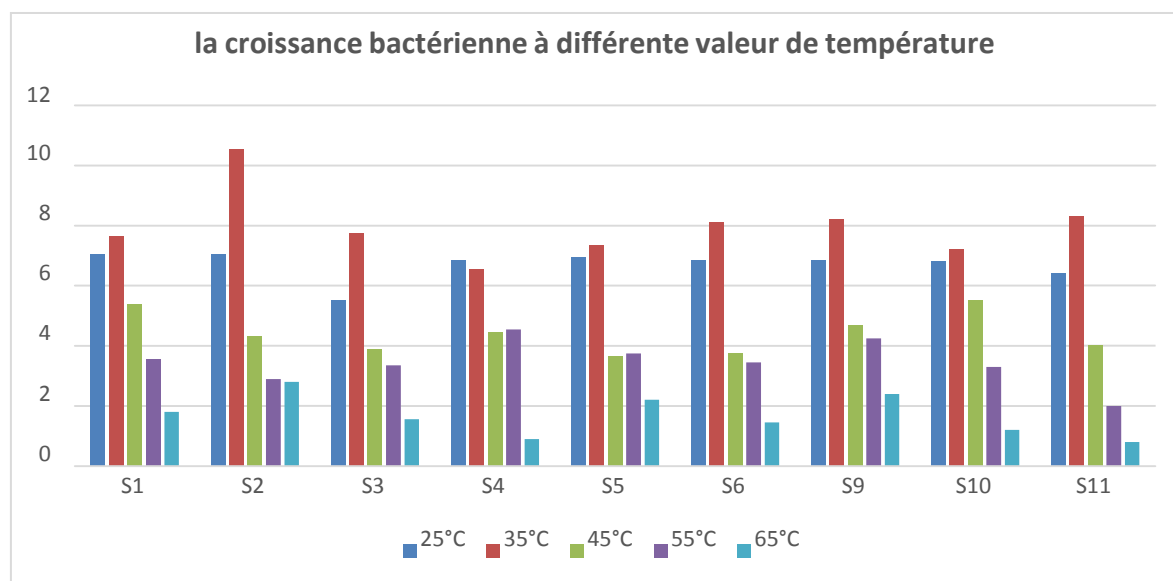


Figure 25 : Effet de la température sur la croissance bactérienne des neuf souches bactériennes isolées.

D'après ce graphe on remarque que l'optimum de croissance se situe entre 25 et 35°C pour l'ensemble des souches. De manière plus précise, ces bactéries telluriques présentent une croissance progressive pour atteindre un niveau maximal entre 25 et 35°C. Ensuite, on note que cette multiplication bactérienne diminue de façon relativement légère à partir de 35°C. D'après la littérature la croissance bactérienne soit normalement inhibée à partir de 55°C (**Amkraz, 2013**), on remarque que les souches testées demeurent viables au-delà de cette température. En effet, leur viabilité a été vérifiée par ensemencement de boîtes de Pétri contenant le milieu GN avec les isolats auparavant incubés aux températures de 50 à 65°C. Ces résultats prouvent que les souches testées tolèrent bien les hautes températures. Ceci pourrait donc conférer à nos souches la possibilité de réduire l'effet nuisible des températures élevées sur ces dernières.

III.3.2. Effet de pH

Les résultats illustrant l'effet de la variation du pH sur la survie et la croissance des souches étudiées sont présentés sur la figure 26. Ces résultats montrent que le développement de ces isolats aux pH de 3 est faible. Cependant, pour des valeurs de pH supérieures à 3, on note que la croissance bactérienne augmente de manière graduelle et le niveau optimal de multiplication bactérienne est obtenu pour des pH compris entre 7 et 9 pour la plus part. Exception faite pour la souche la S6 ou la concentration bactérienne est très faible au pH7 par

contre elle est meilleur au pH alcalin (8 et 9), voir même le pH 5 pour les isolats S1, S9, S10 et S11.

Tous ces résultats montrent bien que ces isolats possèdent une capacité à résister au variation très importante de pH. Ceci offre la possibilité d'utiliser ces isolats antagonistes dans plusieurs sols à différents pH.

La figure ci-dessous montre les fluctuations des concentrations bactériennes selon les variations de pH après incubation 72h dans un agitateur incubateur.

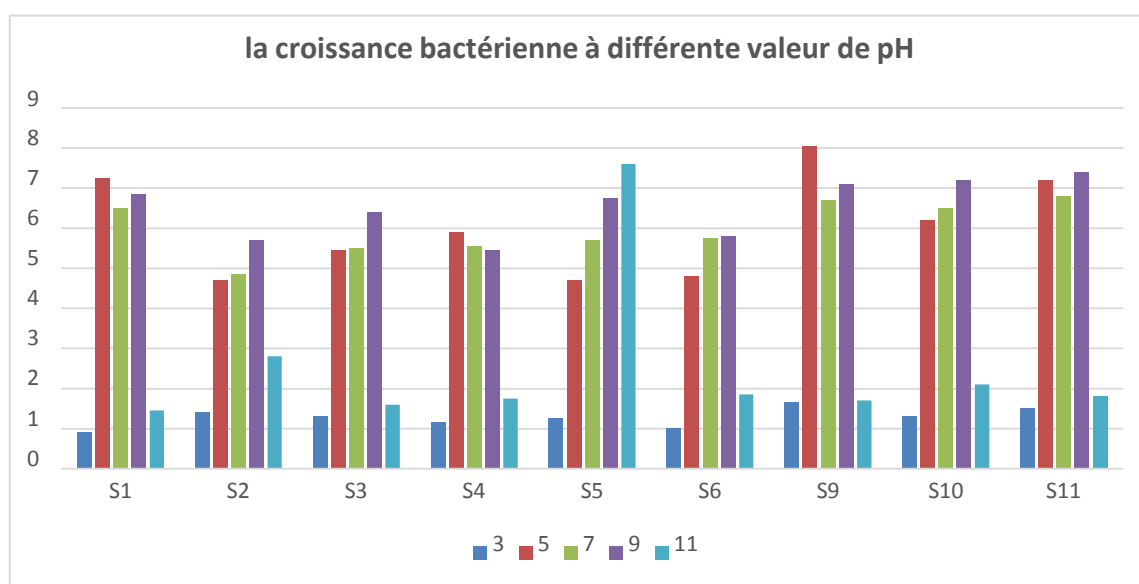


Figure 26 : Effet de la variation du pH sur la croissance des souches bactériennes testées

La mesure du pH d'un sol reflète la concentration des ions OH^- et H^+ à l'état dissocié dans le liquide surnageant. Les résultats obtenus montrent que le PH a un effet sur la croissance des isolats de Bacillus. Tous les isolats ont la capacité de bien poussées à un pH =6. Cependant certains isolats ont une croissance optimale dans une gamme de pH acide pH= 5 ou très alcalin PH=9 (S2, S3, S4, S10, S11), et certains d'autres dans pH acide (S6) ainsi que S1 qui pousse bien dans pH= 7 (neutre).

D'après **Carrow et al, (2001)**, les bactéries du sol préfèrent une certaine gamme du pH allant de 6 à 8 pour leur croissance parallèlement à certains de notre souche qui préfèrent de survivent dans ces valeurs de pH comme S2.

III.3.3. Résultat de l'effet de la salinité

Les résultats illustrant l'effet des différentes concentrations de sel NaCl sur les souches bactériennes isolées sont présentés sur le tableau ci-dessous, on observe que la croissance bactérienne diminue progressivement lors de l'augmentation de la concentration de l'NaCl. Cependant, l'ampleur de cette diminution varie d'une concentration à l'autre. Il est important donc de noter que la multiplication bactérienne est plus affectée par les concentrations élevées de NaCl.

Tableau 7: La densité optique des souches bactériennes testées après incubation à 48 h dans l'incubateur agitateur .

Souches	D.O à NaCl=2,5	D.O à NaCl=5	D.O à NaCl=7,5	D.O à NaCl=10
S1	1,791	0,869	1,671	0,281
S2	2,268	2,018	1,020	0,173
S3	0,902	0,660	0,653	0,153
S4	1,718	1,731	1,130	0,169
S5	1,708	1,242	1,244	0,988
S6	1,921	1,240	1,083	1,162
S9	2,387	1,387	0,556	0,514
S10	1,519	1,393	0,533	0,185
S11	1,162	0,919	1,360	0,255

D'après le tableau on remarque une résistance de nos bactéries au stress salin appliqué par l'addition de différentes concentrations de NaCl, malgré que les optimums de développement sont obtenus à des concentrations faibles, mais elles sont toutes bien développées dont les différentes concentrations dépassent les 10^9 cellules bactérienne/ml de culture pour les isolats S5 et S10 pour des concentrations de 10 % de NaCl.

Il est clairement admis que les cultures végétales sont régulièrement confrontées à une variété de stress liés à l'environnement. Parmi ces facteurs de stress, la salinité du sol constitue un des facteurs limitant la productivité végétale. Le rôle des bactéries P.G.P.R. vis-à-vis des plantes ne pourrait donc s'exercer et aboutir à des effets bénéfiques significatifs et

durables que si ces rhizobactéries résistent bien au stress salin. Nos résultats traduisent bien cette propriété d'halo tolérance des neuf bactéries qui pourraient continuer à exercer leurs effets phyto-protecteurs et stimuler la croissance des plants même dans des conditions de salinité élevées.

Conclusion

L'isolement et l'identification des bactéries d'intérêt à partir de sols halophiles sont d'une importance significative dans le domaine de la microbiologie environnementale. Les sols halophiles sont des environnements riches en sel, ce qui crée des conditions extrêmes et sélectives pour la survie des organismes.

Onze souches bactériennes ont été isolées à partir de sol de Sebkhha de Bordj Omar Dris, dont neuf isolats présentent une forme bacillaire à Gram positif, par contre les deux autres isolats possèdent un Gram positif et une forme en cocci. Les neuf isolats de formes bacillaires (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S9, S10 et S11) ont été sélectionnées pour le reste du travail par contre les isolats S7 et S8 ont été exclus de la collection suite à leurs forme en cocci.

Dans cette étude, un screening de plusieurs activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires (lipase, protéase, amylase, pectinase et cellulase), en plus de l'activité lipasique qui a été testée sur deux substrats différents à savoir le Tween 80 et le Tween20. Des résultats très satisfaisants ont été obtenus. Ces enzymes extracellulaires, importantes pour leurs survies et leurs disséminations dans un sol contenant des milliers des micro-organismes en plus ces enzymes sont très recherchées en divers secteurs industriels.

A ce résultat s'en rajoute le pouvoir fixateur d'azote moléculaire N_2 qui est observé chez la totalité des souches, à l'exception de la S1, et aussi la production de l'ammoniac NH_3 , forme assimilable par les plantes.

L'estimation de l'effet protecteur des plantes par nos isolats dans des conditions de stress (salinité, basse ou haute température et pH....) pourrait être recherchée comme suite logique de ce travail afin de s'assurer de la capacité des isolats à résister à ces conditions extrêmes tout en protégeant la plante et l'aidant à mieux tolérer ces conditions.

Cette contribution à l'étude de la mise en évidence des activités enzymatiques extracellulaires des isolats de *Bacillus* isolées de la sabkha de Bordj Omar Idris située à ILLIZI a donné des résultats très encourageants qui devront être utilisés pour améliorer le rendement en agricole future vue leurs pouvoirs de colonisation des sols et des tissus végétales confirmés par la production d'une gamme très diversifiée d'enzymes hydrolytiques (Pectinase, lipase, cellulase et amylase), leurs pouvoirs de dégradation des membranes des

champignons phytopathogènes par la production des CWDE à savoir les glucanases et les protéases, en plus de leurs pouvoirs de stimulation de la croissance des plantes cultivées par la fixation de l'azote moléculaire et la production de l'ammoniac. Ces isolats se sont montrés capable de résister aux conditions extrêmes de milieu (Température, pH et salinité) donc ils peuvent être utilisés dans des programmes de développement durable bien étudiés et en application biotechnologie dans le future.

Perspectives

- Le présent travail ouvre de nouvelles perspectives d'approfondissement des connaissances relatives non seulement sur l'utilisation des méthodes plus poussées pour l'identification et la caractérisation de nos souches par des moyens biochimiques et moléculaire mais aussi testées d'autres substrats pour la détection d'autres activité enzymatiques tels que la chitine et la recherche d'autres molécules tels que les biosurfactants, les hormones de croissance ..ect.,
- Un autre volet peut être envisagé c'est l'étude des mécanismes d'action des meilleurs isolats antagonistes du genre *Bacillus* tout en vérifiant s'il s'agit d'un mécanisme de compétition direct (nutritive, spatiale, parasitisme) ou indirect (induction de mécanismes de défense aussi bien anatomiques que biochimiques).
- Passé de l'étude *in vitro* à l'étude *in situ* pour mieux valoriser les résultats.

Résumé

Les écosystèmes aquatiques hypersalins, tels que les Chotts et les Sebkhas, présentent des milieux extrêmement hostiles où les ressources nutritives sont rares et la salinité peut atteindre des niveaux de saturation. Malgré ces conditions extrêmes, une diversité biologique parvient à prospérer dans ces environnements. L'isolement et l'identification macroscopique, microscopique (coloration de Gram, état frais et mannitol mobilité) et biochimique (recherche des enzymes: amylase, pectinase, protéase, lipase, cellulase, glucanase, ainsi que la recherche des enzymes respiratoires (oxydase et catalase) et d'autres enzymes : production de NH₃ et l'étude physiologique (effet de température, salinité, pH, 9 isolats obtenus (S1 ; S2, S3, S4, S5, S6, S9, S10, S11) sont ciblés. La coloration de Gram a été montrée que ces souches sont des bacilles à Gram positive. Des tests enzymatiques montrent que 91% des souches sont capables de produire des enzymes et les tests physicochimiques (température, salinité, pH) montrent que ces bactéries sont résistantes aux conditions extrêmes sont ciblés. Ces bactéries halophiles du genre *Bacillus* à partir des sols de Bordj Omar Driss ont permis d'identifier des souches adaptées aux conditions salines et présentant des activités bénéfiques pour la croissance des plantes. Ces résultats ouvrent la voie à des recherches plus approfondies sur l'exploitation de ces souches dans des applications agricoles spécifiques visant à améliorer la productivité des cultures dans les régions arides et salines.

Mots clés : Hypersalins, tests enzymatiques, sebkha, salinité, PH, extremophiles, Gram, microorganismes, *Bacillus*.

Abstract

Hypersaline aquatic ecosystems, such as Chotts and Sebkhas, represent extremely hostile environments where nutrient resources are scarce and salinity can reach saturation levels. Despite these extreme conditions, a biological diversity manages to thrive in these environments. Research has revealed the existence of extremophile microorganisms capable of surviving and adapting to the extreme conditions of these environments. Nine isolates obtained from a soil sample of Sebkha de Bordj Omar Driss (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S9, S10, S11) were investigated for their plant growth-promoting characteristics. Gram staining showed that these strains are Gram-positive bacilli. Enzymatic tests (cellulase, amylase, protease, esterase and lipase, glucanase, nitrogen fixation, pectinase, ammonium production) and physicochemical tests (temperature, salinity, pH) were conducted. These halophilic bacteria of the genus *Bacillus* from the soils of Bordj Omar Driss have identified strains adapted to saline conditions and exhibiting beneficial activities for plant growth. These results pave the way for further research on harnessing these strains for specific agricultural applications aimed at improving crop productivity in arid and saline regions.

Keywords: Hypersaline, enzymatic tests, Sebkha, salinity, pH, extremophiles, Gram, microorganisms, *Bacillus*.

المخلص

تمثل النظم البيئية المائية شديدة الملوحة، مثل الشط و السبخة، بيئات معادية للغاية حيث تندر الموارد الغذائية و يمكن أن تصل الملوحة الى مستويات التشبع. على الرغم من هذه الظروف القاسية، فإن التنوع البيولوجي قادر على الازدهار في هذه البيئات. كشفت الأبحاث عن وجود الكائنات الحية الدقيقة المتطرفة القادرة على البقاء والتكيف مع الظروف القاسية لهذه البيئات.

تم فحص تسع سلالات مأخوذة من عينة تربة سبخة برج عمر ادريس (S11, S10, S9, S8, S6, S5, S4, S3, S2) لمعرفة خصائصها المحفزة لنمو النبات. أظهر تلوين غرام أن هذه السلالات هي عصيات إيجابية الجرام. أجريت الاختبارات الإنزيمية (السليلاز، الأميلاز، البروتياز، الليباز، الجلوكانيز، تثبيت النيتروجين، البكتيناز، إنتاج الأمونيوم) و الاختبارات الفيزيائية (درجة الحرارة، الملوحة، الأس الهيدروجيني). حددت هذه البكتيريا المحبة للملوحة من جنس *Bacillus* من تربة برج عمر ادريس سلالات تتكيف مع الظروف الملحية و تظهر أنشطة مفيدة لنمو النبات. تمهد هذه النتائج الطريق لمزيد من البحث حول تسخير هذه السلالات لتطبيقات زراعية محددة تهدف إلى تحسين إنتاجية المحاصيل في المناطق القاحلة والمالحة.

الكلمات المفتاحية: التحاليل الملحية، الأنزيمية، السبخة، الملوحة - الرقم الهيدروجيني، الكائنات الحية الدقيقة، الجرام، العصيات.

Annexe 01. Matériel utilisé

1) Appareillage

- Autoclave
- Bain marie
- Spectrophotomètre à absorption atomique
- Etuve
- Vortex
- Balance
- pH mètre
- Plaque chauffante agitatrice
- Bec Benzène
- Réfrigérateur

2) Instruments

- Boîtes pétri
- Béchers
- Erlenmeyer
- Tubes à essai
- Flacons
- Portoirs des tubes
- Pipettes pasteur
- Seringues
- Embouts bleu
- Micropipette
- Spatule

3) Réactifs utilisés

- Lugol
- Rouge congo
- Réactif de Nessler

Annexe 02. La fixation d'azote

1g KH_2PO_4

0,01g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2g NaCl

0,005g FeSO_4

20g Mannitol

15g Agar

Annexe 03. Les tampons de Ph

A : Solution de phosphate monosodique 0.2M (soit 27.8 g de KH_2PO_4 dans 1000 ml d'eau distillée).

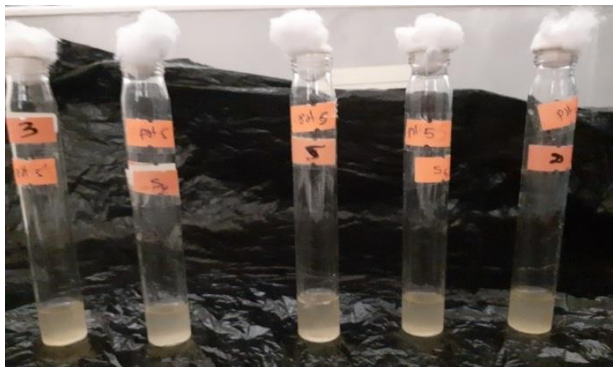
B: Solution de phosphate de sodium dibasique 0.2M (soit 53.55 g de K_2HPO_4 dans 1000 ml d'eau distillée).

Mélanger x ml de A et y ml de B auxquels on ajoute 100 ml d'eau distillée stérile pour obtenir les valeurs suivantes

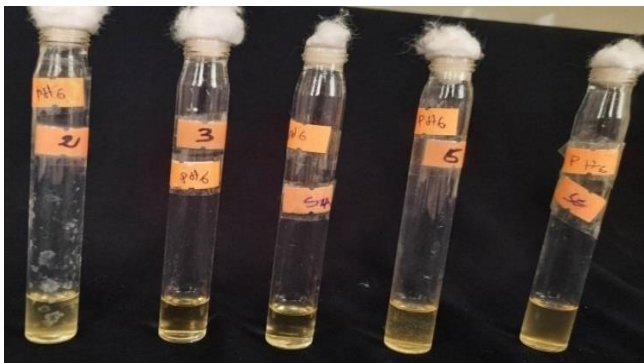
pH	X (ml)	Y (ml)
5	98.3	1.7
6	87.7	12.3
7	39	61
8	5.3	94.7
9	00	100

Annexe 04. Effet de la salinité

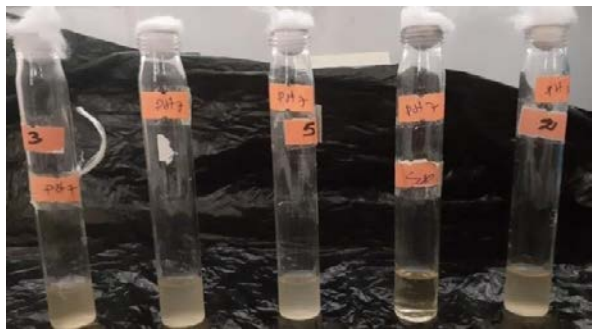
pH5



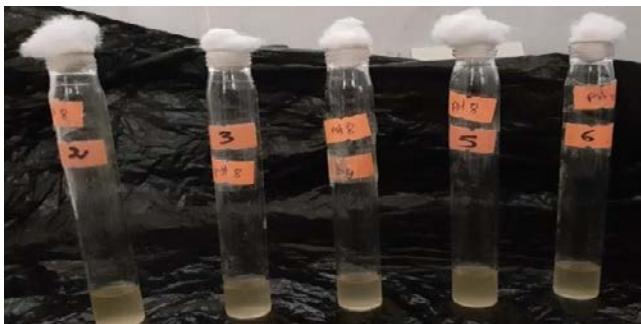
pH6



pH7



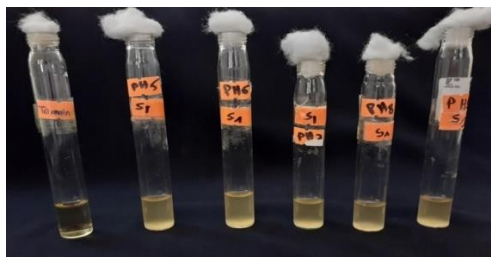
pH8



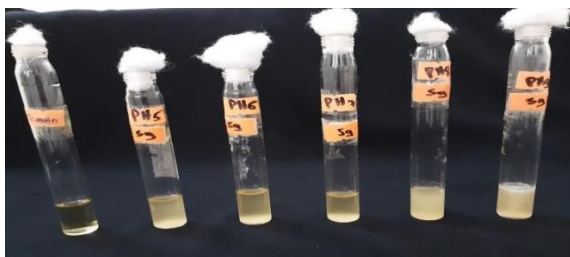
pH9



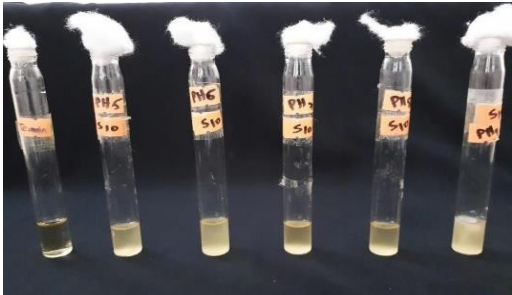
S1



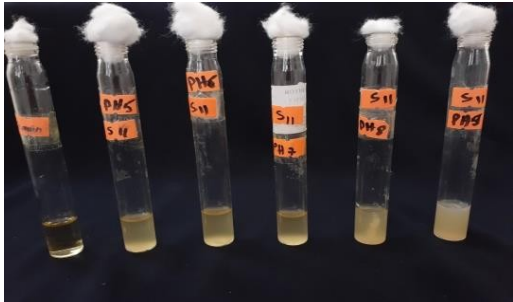
S9



S10



S11



A

- **Abdelhafid Y. (2010).** Cartographie de la salinité des sols par induction électromagnétique. Cas de la zone est du périmètre irrigué de la mina. Mémoire de Magister en science agronomiques. Ecole nationale supérieure agronomique d'el Harrach- Alger.
- **Abe. F et Horikoshi. (2001).** The biotechnological potential of piezophiles. Trends in Biotechnology, 19: 102-108.
- **Abnatura RD. (2013).** Les Rhizobactéries PGPR. Bulletin Technique. Avril 2013 Issue. <http://www.abnatura.com/ESW/Files/abnatura_bulletin. (Accessed 21.04.18).
- **Adapa V. et Ramya L.N. Pulicherla. (2014).** Cold active pectinases: advancing the food industry to the next generation. Biotechnology and Applied Biochemistry, 172 (5), 2324- 2337.
- **Aggarwal R., Dutta T. et Sheikh J .(2019).** Extraction of amylase from the microorganism isolated from textile mill effluent vis a vis desizing of cotton. Sustainable Chemistry and Pharmacy, (14).
- **Ahmad, M. & Kibret, M. (2013).** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. J King Saud Univer-Scien 26(01): 1-20.Algérie.
- **Ahmed, O.H., H. Aminuddin et M.H.A. Husni .(2008).** Ammonia volatilization and ammonium accumulation from urea mixed with zeolite and triple superphosphate. Acta Agric. Scand., 58: 182-186. Jijakli. (2003). lutte biologique in phytopathologie in phytopathologie. Lepoivre P .ed De boeck et larvier s.a.289-317.
- **Ait kaki A.(2017).** L'α-Amylase d'une nouvelle souche de Rhizopus oryzae FSIS4 isolée de blé des zones arides : Production, Purification, Caractérisation, Etude des propriétés et Essai de panification. Thèse de doctorat d'état, Université Frères Mentouri, Constantine 1,142p.
- **Amoozgar M. A., Malekzadeh, F., Malik, K. A.(2003).** Production of amylase by newly isolated moderate halophile, Halobacillus sp. strain MA-2. Journal of microbiological methods 52(3) : 353-359.
- **Andrei, A.Ş., 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.
- **Antón, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodríguez-Valera, F., Amann, R., Rosselló-Mora, R. (2002).** Salinibacter ruber gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52(2), 485-491.
- **Antoine.D, (2022).** Extrémophile : Définition, caractéristiques et exemples
- **Arora NK, Tewari S, Singh S, Lal N, Maheshwari DK .(2012).** PGPR for protection of plant health under saline conditions. In: Maheshwari DK (ed.) Bacteria in agrobiology: Stress management, pp.239-258.
- **Askri. B., Bouhlila. R., Olivier. J.(2003).** Modélisation des transferts d'eau et de sels dans les systèmes Oasiens. Cas de Segdoud dans le sud Tunisien. Congrès de :

ADENIT Association des anciens de l'école Nationale d'ingénieurs de Tunisie –SHF société Hydrotechnique de France-, ENITE ECOLE nationale d'ingénieurs de Tunisie– et INAT Institut National Agronomique de tunisien et avec le soutien de la direction de l'eau de Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable de la République française. Tunis, les 20,21 et 22 mai 2003, pp: 175- 183.

- **Awais M., Aamer A. S., Abdul H. and Fariha H. (2007).** Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by bacillus sp. Pak. J. Bot., 39(4): 1303-1312

B

- **Babalola, O.O. (2010).** Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 32:1559–1570.
- **Baca B.E. et Elmerich C. (2007).** Microbial Production of Plant Hormones. In: Elmerich C., Newton W.E. (Eds). *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, Springer, Netherlands. pp. 113-143.
- **Bach H.J et Munch J.C. (2000)** .Identification of bacterial sources of soil peptidases.*Biol Fertil Soils*.31, 219-224.
- **Badraoui. M., Soudi. B., Ferhat. A.,(1998)** .Variation de la qualité des sols une base pour évaluer la durabilité de la mise en valeur agricole sous irrigation par pivot au Maroc. *Etude et gestion des sols*, 5, 4, pp.227-234.
- **Barraquio, W. L., E. M. Segurbre, M. S. Gonzalez, S. C. Verma, E. K. James, J. K. Ladha, and A. K. tripathi. (2000).** p. 93-118. In the Quest for nitrogen fixation in rice, (ed.), IRRI, Los Banos, Philippines.
- **Benkahoul M., Talhi A., Boulefkhad N.(2017).** Bactéries des environnements chauds Algériens: isolement et mise en évidence de la production d'hydrolases. *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies* (45) : 25-35.
- **Berrgui. F. et Bireche. Y. (2014).** Effets de la salinité sur l'activité des bactéries hydrocarbonoclastes. Thèse de Master Académique, Université de Ouargla, Algérie.
-
- **Bertoldo C ., Grote R.,et Antranikian G., (2001).** Biocatalys in under extreme conditions. *Biotechnology Set*, Second Edition, 61-103.
- **Bharathi, D., & Rajalakshmi, G. (2019).** Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101368.
- **Bhattacharyya PN, Jha DK .(2012).** Plant growth-promoting rhizobacteria(PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 28: 1327-1350.
- **Bot, A., et Benites, J. (2005).** The importance of soil organic matter: Key to drought resistant soil and sustained food production (No. 80). Food & Agriculture Org.
- **Boutaiba, S., Hacène, H., Bidle, K. A., Maupin-Furlow, J. A. (2011).** Microbial diversity of the hypersaline SidiAmeur and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. – Arid Environments 75(10): 909-916.
<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2011.04.010>.

- **Bouteyre, G., et Loyer, Y.1992.** Sols sales eaux saumâtres des régions arides tropicales et méditerranéennes in l'aridité, une contrainte au développement. ORSTOM ,Paris.
- **Briat, J.F. (1992).** Iron assimilation and storage in prokaryotes. J. Gen. Microbiol., 138:2475-2483.
- **Bron S., Meima R., Diji J. M. V., Wipat A. and Harwood C. R. (1999).** Molecular biology and genetics of *Bacillus* spp. In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology 2nd Edition. Eds. Demain A. L. and Davies J. E., ASM Press. Washington, D.e. 392-416.

C

- **Camille. D. (2007).** Pratique en microbiologie de laboratoire, recherche de bactéries et de levures.
- **Cappuccino, J.C. & Sherman, N. (1992).** In: Microbiology: A Laboratory Manual, Benjamin- Cummings Publishing Company, New York, pp. 125-179.
- **Carrim A.J.I., Barbosa E.C. et Gonçalves V.J.D. (2006).** Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). Braz Arch Biol Techn. 49:353-359.
- **Carrow R.N., Wassington D.V. and Rieke P.E. (2001).** Turfgrass soil fertility and chemical problems: Assessment and management. John Wiley & Sons, Inc. pp.273.
- **CENTRE D'ETUDES ET DE RESALISATIONS IN URBANISME CONSTANTINE; (1996).** Plan directeur d'orientation et d'urbanisme (Bordj Omar Driss) URBACO-SPA.Constantine, 53 P.
- **Cheikh Rouhou. M. (2006).** Évaluation des classifications phylogénétiques des bacillaceae basées sur les gènes de l'opéron.
- **Chevery.Y. C., (1995).** Comportement des plantes en milieu salé. Compte rendu de l'Acad d'agri de France. Action N° 04 (1995) Rev. Bimestrielle, Vol 81 (2), Paris, pp:42-46.
- **Chevery C., Bourrier., (1998).** La salinisation des sols. In Stengel et Sgeline (ed) sol : Interface fragile. INRA, Paris, pp : 109-127.
- **Corbaz R. (1990).** Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presse polytechniques et universitaires romandes.
- **Cowan. D . A., Ramond. J .B., Makhalanyane. T .P ., DeMaayer. P. (2015).** Curr Opin Microbiol 25,97-102.
- **Csonka L.N. (1989).** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. Microbiology Reviews, 53(1), 121-147.

D

- **D'Amico S., Collins T., Marx JC., Feller G., Gerday C. (2006).** Psychrophilic micro-organisms: challenges for life. *EMBO. Rep*; 7: 385-389.
- **Dajoz. R., (1971).** Précis d'écologie. Ed. Dunod, Paris, 434 p.
- **Daoud L. et Ben Ali M. (2020).** Halophilic microorganisms: Interesting group of extremophiles with important applications in biotechnology and environment; in: Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles, 51-64.

- **DasSarma, S., DasSarma, P. (2017).** Halophiles. In: eLS, Wiley Ltd: Chichester, p:1-13.
- **De Champdoré M., Staiano M., Rossi M. and D'Auria S. (2006).** Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. *J. Royal Society. Interface* 4, 183-191.
- **De la Haba R. R., Sánchez-Porro, C., Ventosa, A. (2011).** Taxonomy, phylogeny, and biotechnological interest of the family Halomonadaceae. In *Halophiles and Hypersaline Environments* (pp. 27-64). Springer, Berlin, Heidelberg.
- **De Salamon I.G., Hynes R.K. and Nelson L.M. (2005).** Role of Cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria. P. 173-195. In Siddiqui A. A. (ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*.
- **De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B. (2009).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., The Firmicute. Springer. New York. Volume 3. 63-67.
- **De, T. K., Sarkar, T. K. De, M. Maity, T.K. Mukherjee, et S. Das. (2011).** Abundance and occurrence of phosphate solubilizing bacteria and phosphatase in Sediment of Hooghly estuary, north east coast of Bay of Bengal, India. *Journal of Coastal Development*. 15: 9-16.
- **del Estado de Jalisco. (2015).** Bacterias halófilas aisladas de Cuatro Ciénegas. Disponible en: <https://centroconacyt.mx/objeto/bacterias-halofilas-aisladas-de-cuatro-cienegas/>
- **Delgado-Garcia M., Aguilar C.N., Contreras-Esquivel J.C., Rodriguez-Herrera. R. (2014).** Screening for extracellular hydrolytic enzymes production by different halophilic bacteria. *Mycopath*. 12 (1): 17-23.
- **Demirkan, E., Sevgi, T., & Başkurt, M. (2017).** Optimization of physical factors affecting the production of the α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. M10 strain. *Karaelmas Fen ve* .7(1), 23-30.
- **Denis B. (2000).** Guide des analyses en pédologie, 2eme édition. 266P.
- **Dietrich. J et Guezennec .J.(2023).** « EXTRÉMOPHILES », Encyclopædia Universalis [en ligne], URL : <https://www.universalis.fr/encyclopedie/extremophiles/>
- **Dikilitas, M. et Karakas, S. (2012).** Behavior of Plant Pathogens for Crops Under Stress During the Determination of Physiological, Biochemical, and Molecular Approaches for Salt Stress Tolerance. In: Ashraf, M. et al. (eds). *Crop Production for Agricultural Improvement*. Springer Science+ Business Media B.V. Dordrecht, The Netherlands, pp 417-441.
- **Dommergues Y. and Mangenot F. (1970).** Écologie Microbienne du sol. Masson, Paris.
- **Douaoui, A., Hartani, T. (2008).** Impact de l'irrigation par les eaux souterraines sur la dégradation des sols de la plaine du Bas-Chellif. *Scientific commons*. Vol. 2, no3, pp. 9.
- **DURAND JH., 1983-** Les sols irrigables. Études pédologiques. Edit imprimerie Boudin, Paris, 339p.

E

- **Edbeib, M. F., Wahab, R. A., Huyop, F. (2016).** Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8), 135.
- **Elie, F. (2022).** Archéobactéries ou Archées, et les trois grands domaines du vivant. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/366311426_Archeobacteries_ou_Archees_et_les_trois_grands_domaines_du_vivant
- **Esmaili Dahest, L., Negarestan, H., Eimanifar, A., Mohebbi, F., & Ahmadi, R. (2010).** The fluctuations of physicochemical factors and phytoplankton populations of Urmia Lake, Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 9(3), 368-381.
- **Essinyton, M.E. (2005)** .Soil and water chemistry, and integrative approach .CRC. Press.USA.

F

- **Fardeau ML, Gounant C, Dorleac N, Cayol JL et Ollivier B.(2005).** Isolation and phylogenetical Characterization of anaerobic thermophiles originating from thermal springs in France. In *Thermophiles 05 – From evolution to revolution*. International Conference, Griffith University, Australia ;86. 4.
- **Fernandez. (1999).** Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Austral. Plant Pathol.* 28:21–26.
- **Fickers P, Destain J et Thonart P. (2008).** Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications .*Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12 (2): 119-130.
- **Flores-Gallegos, A. C., Delgado-García, M., Ascacio-Valdés, J. A., Villareal-Morales, S., Michel-Michel, M. R., Aguilar-González, C. N., & Rodríguez-Herrera, R. (2019).** Hydrolases of halophilic Origin with importance for the food industry. In *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 197-219). Academic Press.

G

- **Gana, M. L., Kebbouche-Gana, S., Touzi, A., Pauss, A., Lounici, H. (2010).** Antagonistic activity of *Bacillus* sp. obtained from an algerian oilfield and chemical biocide THPS against Sulfate-reducing bacteria consortium inducing corrosion in the oil industry. – *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38(3): 391-404.
- **Gareeb, A.P. et Setati, M.E. (2009).** Assessment of alkaliphilic haloarchaeal diversity in Sua pan evaporator ponds in Botswana. *African Journal of Biotechnology*, 8: 259-267.
- **Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W.A. and Krieg, N.R. (1994).** *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington DC, ASM, USA.

- **Ghassemi, F., Jakeman, A.J., Nix, H.A. (1995).** Salinisation of land and water resources: human causes, extent, management and case studies. Center for resource and environmental studies, The Australian National University, Canberra, Australia, pp. 125.
- **Ghosh S., Kumar S., Kumar Khare S. (2019).** Microbial Diversity of Saline Habitats: An Overview of Biotechnological Applications. In: Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions, *Springer*, 65-92.
- **Glick B. R., C. L. Patten, G. Holguin, et D. M. (1999).** Penrose, Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria, Imperial College Press, London, UK.
- **Glick B.R., Pasternak, J.J. (1998)** .Principles and applications of recombinant DNA. ASM, Washington DC 683.
- **Grant W.D., Kamekura M., McGenity T.J, et Ventosa A.,(2001).** Order I Halobacteriales. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. I, 2nd Ed). New York. p. 294.
- **Guan, T. W., Xia, Z. F., Xiao, J., Wu, N., Chen, Z. J., Zhang, L. L., Zhang, X. P. (2011).** *Glycomyces halotolerans* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a hypersaline habitat in Xinjiang, China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(1), 137-143.
- **Guemori-Athmani, S., O. Berge, , M. Bourrain,, P. Mavingui, , JM. Thiery, T. Bhatnagar et T. Heulin (2000).** Diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian soils. *Eur. J. Soil Biol.* 36 :149–159
- **Guemori-Athmani, S., O. Berge,, M. Bourrain,, P. Mavingui, , JM. Thiery, T. Bhatnagar et T. Heulin (2000).** Diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian soils. *Eur. J. Soil Biol.* 36:149–159.
- **Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., & Oren, A. (2018).** Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(3), 353-375.
- **Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., & Plemenitaš, A. (2009).** Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*, 113(11), 1231-1241.
- **Gupta G, Singh Parihar S, Kumar Ahirwar N, Kumar Snehi S et Singh V. (2015).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *J Microb BiochemTechnol.* Volume 7(2), 96-102.
- **Gupta R, Gupta N et Rathi P. (2004).** Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64, 763–781.
- **Guzmán M.N., Vargas V.A., Antezana H. and Svoboda M. (2008).** Lipolytic enzyme production by halophilic/halotolerant microorganisms isolated from laguna verde, bolivia. Centro de Biotecnología – UMSS, Cochabmamba - Bolivia; Laboratoire de Chimie Biologique – Université Libre de Bruxelles, Belgium. 25(1).

H

- **Haba R. R., Sánchez-Porro, C., Ventosa, A. (2011a).** Taxonomy, phylogeny, and biotechnological interest of the family Halomonadaceae. In *Halophiles and Hypersaline Environments* (pp. 27-64). Springer, Berlin, Heidelberg.
- **HALITIM A., (1988).** Les sols des régions arides d'Algérie. Ed.O.P.U. Alger. p385.
- **Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W. (2005).** Characterization of a novel plant growth-promotingbacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotrophand a potential biocontrol agent against various plant pathogens.Syst Appl Microbiol 28(1):66–76.
- **Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W. (2005).** Characterization of a novel plant growth-promotingbacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotrophand a potential biocontrol agent against various plant pathogens.Syst Appl Microbiol 28(1):66–76.
- **Harding, T., & Simpson, A.G.B. (2018).** Recent advances in halophilic protozoa research. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 65(4), 556-570.
- **Health Protection Agency. (2011a).** Catalase Test. UK Standards for Microbiology Investigations. 8 Issue 2.2.
- **Health Protection Agency.(2011b).** Oxidase Test. UK Standards for Microbiology Investigations. 26 Issue 2.2.
- **Helluy, S., & Holmes, J.C. (2005).**Parasitic manipulation: further considerations. *Behavioural processes*, 68(3), 205-210.
- **Honda K , Kataoka M , Ono H , Sakamoto K , Kita S et Shimizu S.(2002).** Purification and characterization of a novel esterase promising for the production of useful compounds from *Microbacterium* sp. 7-1W. *FEMS Microbiology Letters*. 206, 221-227.
- **Hopkins WG. (2003).** physiologie végétale. Traduction de la 2 edition américaine par SERGE R .Ed de Boeck.pp. 309-362.
- **Horikoshi K. (1999).** Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63: 735–750.

I

- **Irwin J. A., Baird A. W. (2004).** Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Irish Veterinary Journal*. Volume 57 (6).

J

- **Jacques D et Jean G. (2023).** « EXTRÉMOPHILES ». *Encyclopædia Universalis* [en ligne]. consulté le 29 mars 2023.
URL<https://www.universalis.fr/encyclopedie/extremophiles/>
- **Ji SH , Gururani MA et Chul CS. (2014).** Isolation and characterization of plant growth promoting endophyticdiazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*. 169, 83– 98.
- **Jiang H., Dong H. Zhang G., Yu B., Chapman L. R. and Fields W. M. (2006).**Microbial diversity in water and sediment of lake chaka, an athalassohaline

lake in Northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3832–3845.

- **Jijakli. (2003).** lutte biologique in phytopathologie in phytopathologie. Lepoivre P .ed De boeck et larvier s.a.289-317.
- Joana LA Brás , Alan Cartmell , Ana Luísa M. Carvalho hgilbert@ccrc.uga.edu,+9, et Harry J. Gilbert 10 mars 2011 108 (13) 5237 - 5242.

K

- **Kavitha T., Nelson R. et Jesi S.J. (2013).** Screening of rhizobacteria for plant growth promoting traits and antifungal activity against charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*, *Int. J. Pharm. Bio Sci.* 4: 177-186.
- **Kirtel, O., Versluys, M., Van Den Ende, W., & Oner, E. T. (2018).** Fructans of the saline world. *Biotechnolog Advances*, 36(5), 1524-1539.
- **Kloepper J.W. (1993).** Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents in Soil microbial ecology-applications in agricultural and environmental management. Metting, F.B. Jr. (ed.). Mercel Dekker, New York, pp 255-27.
- **Kloepper JW, Gutierrez-Estrada A, McInroy JA. (2007).** Photoperiodregulates elicitation of growth promotion but not inducedresistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Can J Microbiol* 53(2):159–167.
- **Kopečný J., Hodrová B. et Stewart C.S. (1996).** The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* 23:195-198.
- **Korish M., (2003).** Production, Purification, Properties and Application of the Cellulases from a Wild type Strain of a Yeast isolate. Thèse de doctorat d'état, university Mainz, Egypt, 113p.
- **Krieg, A. (1981).** In The genus *Bacillus*: insect pathogen in the prokaryotes, a handbook on habitats, isolation, identification of bacteria. Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. and Schlegel, H.G. New York: Springer-Verlag. 2: 1743 - 1755.
- **Kristjánsson, J.K., Hreggvidsson, G.O. (1995).** Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11, 17–25.
- **Kumar, P. P., Jansi, R. S., Kumar, P. S., Christudas, I. N., Raj, J. P., Vijayakumar, A., & Ignacimuthu, S. (2017).** Optimization of biosynthesis parameters, partial purification and characterization of extracellular lipase from soil derived *Streptomyces* sp. *Loyola Lipase-1. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 241-247.
- **Kushner D. et Kamekura M. (1988).** Physiology of halophilic Eubacteria. In: RodriguezValera, F. (Ed.), *Halophilic Bacteria*.

L

- **Laurent T. (2020).** Microorganismes halophiles_ Application biotechnologique.
- **Logan N. A et Turnbull P. C. (1999).** Manual of Clinical Microbiology (Murray, P.R., Ed.).
- **Lorck, H. (1948).** Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant*: 142-146.

- **Louami, S. (2012).** Métabolisme et toxicogénèse de *Bacillus cereus*: rôles de l'enzyme fermentaire LdhA et du régulateur rédox Rex. Sciences agricoles. Université d'Avignon.
- **Loyer J.Y., (1991).** Classification des sols salés: les sols salic. Cah. ORSTOM, Serpédo XXVI. 1.51-61.
- **Lu W.J, Wang H.T, Yang S.J, Wang Z.C et Yong FN. (2005).** Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. J. Gen. Appl. Microbiol.51, 353–360.

M

- **Maki ML, Broere M, Leung K, Tet Qin W. (2011).** Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. Int J. Biochem. Mol. Biol. 2 (2): 146-154.
- **Martinez-Salgado M.M., Gutiérrez-Romero V., Jannsens M. et Ortega-Blu R. (2010).** Biological soil quality indicators: a review. In: Mendez-Vilas A. (Ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Formatex, Spain. p. 319-328.
- **Martínez-Viveros. 1, O., M.A. Jorquera, D.E. Crowley, G. Gajardo and M.L. Mora. (2010).** Mechanisms and practical considerations Involved in plant growth promotion by rhizobacteria. J. Soil Sci. Plant Nutr. 10: 293 – 319.
- **Maughan, H., et Vander Auwer, G. (2011).** *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. Infection, Genetics and Evolution, 789-797.
- **McGenity .T.J., Gemmell R.T., Grant W.D., Stan-Lotter H. (2000).** Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. Environ Microbiol 2: 243-250.
- **Menasria, T., Aguilera, M., Hacène, H., Benammar, L., Ayachi, A., SiBachir, A., (2018).** Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. Microbiological Research, 207, 289-298.
- **Messahel. M., Meza. M. (2003).** Evaluation de l'évolution des eaux de la nappe phréatique et profondeur de drainage dans les terres irriguées en milieu saharien. Gestion du risque eau en pays semi-arides. Congrès de ADENIT, SHF, ENIT, INAT et avec le soutien de la direction du ministère de l'Ecologie et du développement durable de la république Française, Tunis, les 20, 21, 22 mai 2003. pp: 157- 162.
- **Michel. D et Pierre.T. (2018).** Les extrémophiles dans leurs environnements géologiques - Un nouveau regard sur la biodiversité et sur la vie terrestre et extraterrestre. Laboratoire de Géologie de Lyon / ENS de Lyon. *Planet-Terre*. (s. d.).
- **Mindari W., Sasongko Edi P. Kusuma Z. et Syekhfani N. (2015).** Characteristics of saline soil and effect of fertilizer application to rice yield, International Journal of Agriculture, 6(1), 7-15.
- **Mohamad, O. A. A., Li, L., Ma, J. B., Hatab, S., Rasulov, B. A., Musa, Z et Li, W. J. (2018).** Halophilic Actinobacteria Biological Activity and Potential Applications. In *Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications* (pp. 333-364).

- **Morozkina. E .V. Slutskaya. E. S., Fedorova. T.V., Tugay. T. I., Golubeva. L. I. et Koroleva. O. V. (2010).** Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46: 1-14.
- **Muratan.C et Papageorgion. G. (1995).** Unusual strong stabilization effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynthesis Research.*, 44 ,243-252.

N

- **Nadeem S.M, Naveed M, Zahir Z.A et Asghar H.N.(2013).** Plant-Microbe Interactions for Sustainable Agriculture: Fundamentals and Recent Advances. In: Arora NK (ed.) *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*. Springer, India, pp. 51-103.
- **Nannipieri P., Giagnoni L., Landi L., Renella G. (2011).** Role of phosphatase enzymes in soil. In: Bunemann EK, Obreson A, Frossard E (eds) *Phosphorus in action*. Springer, Berlin, pp 215–243.
- **Ningthoujam DS, Kshetri P, Sanasam S et Nimaichand S.(2009).** Screening, Identification of Best Producers and Optimization of Extracellular Proteases from Moderately Halophilic Alkalithermotolerant Indigenous Actinomycetes. *World Applied Sciences Journal* 7, 907-916.

O

- **Ongena, M., A. Giger, P. Jacques, J. Dommes et P. Thonart (2002).** Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. *Euro. J. Plant Pathol.*, 108: 187-196.
- **Ordoñez, O.F., Rasuk, M.C., Soria, M.N., Contreras, M., & Farías, M.E. (2018).** Haloarchaea from the Andean Puna: Biological role in the energy mof arsenic. *Microbial Ecology*, 76(3), 695-705. DOI: 10.1007/s00248-018-1159-3.
- **Oren. A. (2002).** Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1(28), 56- 63.
- **Oren. A. (2002).** Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles*, 6, 491-498.
- **Oren. A. (2002a).** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28: 56-63.
- **Oren. A. (2002b).** Halophilic microorganisms and their environments. In: Seckbach J(Ed) *Cellular Origin and Life in Extreme Habitats*. Kluwer Academic, Dordrecht. P. 595.
- **Oren. A. (2006).** The order Halobacteriales. In *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 3*. 3rd edition. Edited by: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. New York: Springer. 113-164.
- **Oren A. (2008).** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 2(4), 1-13.

- **Oren. A. (2011).** Diversity of halophiles. *Extremophiles handbook*, 309-325.
- **Oren. A. (2008).** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4(1), 2.
- **Oren. A. (2004).** Halophilic Microorganisms: Physiology and Phylogeny. In *Kluwer Academic Publishers eBooks* (pp. 413–426).
- **Oren, A. (2020).** The microbiology of red brines. *Advances in Applied Microbiology*, 113, 57-110.
- **Oren, A., Ventosa, A., & Kamekura, M. (2017).** Halobacteria. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust, Chichester, pp. 1-5.
- **Organji, S. R., Abulreesh, H. H., Osman, E. H., et Khider, M. (2015).** Occurrence and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* in food and infant feces. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 515-520.
- **Otajevo F.D et Aluyi HSA. (2011).** Cultural Conditions Necessary for Optimal Cellulase Yield by Cellulolytic Bacterial Organisms as They Relate to Residual Sugars Released in Broth Medium. *Modern Applied Science*. 5 (3): 141-151.

P

- **Papageorgion. G. et Murata. C. (1995).** Unusual strong stabilization effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynthesis Research.*, 44 ,243-252.
- **Park, J. S., & Simpson, A.G.B. (2015).** Diversity of heterotrophic protists from extremely hypersaline habitats. *Protist*, 166(4), 422-437.
- **Patel, A. K., V. K. Singh, R. P. Yadav , J.G. Moir et M. V. Jagannadhama. (2010).** Purification and characterization of a new chitinase from latex of *Ipomoea carnea*. *Process*.
- **Patrick F. (2007).** *Microbes de l'enfer*. Ed. Belin, Pour la science.
- **Patten CL, Glick BR (2002).** Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68:3795–3801.
- **Petit J et Jobin P. (2005).** La fertilisation organique des cultures les bases. *Fédération d'agriculture biologique du Québec*. Bibliothèque nationale de Canada, 48p.
- **Peduzzi. R., Tonolla. M., Boucher-Rodoni. R. (2006).** Milieux extrêmes: Conditions de vie en milieu alpin et milieu marin, *Actes et contributions scientifiques*: p9.
- **Podile A.R et Kishore K.G. (2006).** Plant growth promoting rhizobacteria. In: *physiology, and applications*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1),56-63.
- **Prieur, A. (2008).** Contribution à l'étude de la diversité génétique bactérienne et la caractérisation de bactéries présentes dans des prélèvements atmosphériques. *Sciences du vivant [q-bio]*. Université Paris Sud-Paris.
- **Peduzzi R., Tonolla M., Boucher-Rodoni R., (2006).** Milieux extrêmes: Conditions de vie en milieu alpin et milieu marin, *Actes et contributions scientifiques*: 9p.

R

- **RABHI N.E. (2011).** Isolement de *Pseudomonas* spp. fluorescents d'un sol salé. Effet d'osmoprotecteurs naturels. Diplôme de Magister, Université FERHAT ABBAS Sétif, Algérie.
- **Ramírez, N., Sandoval, A. H., & Serrano, J. A. (2004).** Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(1-2), 12-23.
- **Rao J.L Uma Maheswar, et Satyanarayana T., (2007).** "Improving production of hyper thermostable and high maltose-forming α -amylase by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology and its applications." *Bioresource Technology* 98.2): 345-352.
- **Ratul, S., Nabaneeta, S., Donofrio, R.S and Bestervelt, L. (2012).** Microbial sidérophores. *Journal of Basic microbiology*.52:1-15.
- **Rodriguez-Valera F. (1993).** Introduction to Saline Environments. In : Vreeland R. H. and Hochstein L. I. (Eds), *The Biology of Halophilic Bacteria*. CRC Press Inc., Boca Raton, Pp. 1 – 23.
- **Rodriguez-Valera, F. (1988).** Characteristics and microbial ecology of hyper saline environments. In *Halophilic Bacteria*. 1988; vol. 1, pp 3-30. Edited by F. Rodriguez-Valera. Boca Raton, FL: CRC Press.
- **Rohban R., Amoozegar M.A. et Ventosa A. (2009).** Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36 (3), 333-340.
- **Rohwerder, T. and Sand, W. (2007).** Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. *Engineering in Life Sciences*, 7,301-309.
- **Romanescu, G., Stoleriu, C. C., Enea, A. (2013).** Definition of Lakes and Their Position in the Romanian Territory. In *Limnology of the Red Lake, Romania* (pp. 1-34).
- **Roza Maria Camacho Ruiz (2019).** Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño.

S

- **Sarethy, I. P., Saxena, Y., Kapoor, A., Sharma, M., Sharma, S. K., Gupta, V., & Gupta, S. (2011).** Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(7), 769.
- **Satyanarayana, T., Raghukumar, C., et Shivaji, S. (2005).** Extremophilic microbes: Diversity and perspectives: *Current science*, 89, 78-90.
- **Schallmeyer, Marcus, Ajay Singh, et Owen P. Ward. (2004).** "Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production." *Canadian journal of microbiology* 50.1: 1-17.
- **Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001).** Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances*, 19(8), 627-662.

- **Schippers, B., AW. Bakker et PAHM. Bakker. (1987).** Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:339-358.
- **Shrivastava, P. et Kumar, R. (2015).** Soil Salinity: A Serious Environmental Issue and Plant Growth Promoting Bacteria as One of the Tools for Its Alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22, 123-131.
- **Schwarz W. H. (2001).** The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56: 634–649.
- **Schwieterman, E. W., Kiang, N. Y., Parenteau, M. N., Harman, C. E., DasSarma, S., Fisher, T. M., & Lyons, T. W. (2018).** Exoplanet biosignatures: a review of remotely detectable signs of life. *Astrobiology*, 18(6), 663-708.
- **Setati, M. E. (2010).** Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria. *African Journal of Biotechnology*, 9(11), 1555-1560.
- **Shonkor K.D et Ajit V. (2011).** Role of Enzymes in Maintaining Soil Health. *soil enzymology*. 2, 25-45.
- **Shrivastava, P. et Kumar, R. (2015).** Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi J. Biol. Sci.* 22: 123-131.
- **Singh A., Singh AK. (2017).** Haloarchaea: worth exploring for their biotechnological potential. *Biotechnology Letters*, 39(12), 1793-1800.
- **Singh, J. S. et Singh, D. P. (2013).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Microbes in Sustainable Agriculture. In: Malik A. et al. (eds). *Management of Microbial Resources in the Environment*. Springer Science+Business Media, Dordrecht, The Netherlands, pp 361-385.
- **Smith N. R., Gordon R. E. and Clark F. E. (1952).** Aerobic spore-forming bacteria. U.S. Dept. Agr. Monogr. No16. Washington, D.C. USA.
- **Sougueh C.(2021).** *La Grande muraille verte, au service des milieux et sociétés rurales en zone sahélo-saharienne*. Institut de recherche pour le développement (IRD).
- **Souguir. D., Jouzdan. O., Khouja. M. L., Hachicha. M., (2013).** Suivi de la croissance d’Aloevera en milieu salin : Parcelle de Kalaat Landelous (Tunisie). *Etude et Gestion des Sols*. Vol 20. PP 19-26.
- **Subramani, R., Sipkema, D. (2019).** Marine rare actinomycetes: A promising source of structurally diverse and unique novel natural products. *Marine drugs*, 17(5), 249.
- **Syed Shameer,T. N. V. K. V Prasad. (2017).** Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses.
- **Sylvie L., Dayanira P. Rafael V. (2008).** Biodegradation of Organic Polluants by Halophilic Bacteria and Archea. *Journal of molecular Microbiology and biotechnology*.8; 15:74-92, p 74.
- **Szabolcs, I. (1994).** *Prospects of soil salinity for the 21st century*. *Agrokémia és talajtan*, 43 (1-2). pp. 5-24. ISSN 0002-1873.
- **Tang, S. K., Wang, Y., Guan, T. W., Lee, J. C., Kim, C. J., Li, W. J. (2010).** *Amycolatopsis halophila* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a salt lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(5), 1073-1078.

- **Tanji, K.K (2002).** Salinité dans l'environnement du sol. Dans *les livres électroniques de Kluwer Academic Publishers* (pp. 21–51). https://doi.org/10.1007/0-306-48155-3_2
- **Tortora, G., Caputo, R., Damiano, V., Melisi, D., Bianco, R., Fontanini, G., & Ciardiello, F. (2003).** Combination of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 and protein kinase A antisense causes cooperative antitumor and antiangiogenic effect. *Clinical cancer research*, 9(4), 1566-1572.
- **Turnbull, P. C., et Kramer, J. M. (1995).** Bacillus. In *Manual of Clinical microbiology*, 349-56.

V

- **Van Loon, L.C. (2007).** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 243-254.
- **Ventosa A., Nieto J.J. (1995).** Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol* 11:85–94.
- **Verma A., Kumar S. et Mehta P. (2020).** Physiological and genomic perspective of halophiles among different salt concentrations; in: *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*, 135-151.
- **Vessey, J.K. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571-586.
- **Vidyalakshmi, R., Paranthaman, R., & Indhumathi, J. (2009).** Amylase production on submerged fermentation by *Bacillus* spp. *World Journal of Chemistry*, 4(1), 89-91.

W

- **Wang X., Mavrodi D.V., Ke L., Mavrodi O.V., Yang M., Thomashow L.S., Zheng N., Weller D.M. et Zhang J. (2014).** Biocontrol and plant growth-promoting activity of rhizobacteria from Chinese fields with contaminated soils. *Microbial Biotechnology*. 8: 404- 418. 91-112. New Delhi, Fertiliser Development and Consultation Organization.
- **Weyens N., Monchy S., Vangronsveld J., Taghari. and Lelie D. V. (2010).** Plant-Microbe Partnerships (ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. p. 547-257.

Y

- **Yang Z, Liu S, Zheng D, Feng S. (2006).** Effects of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities. *J. Environ.* 18 (6): 1135-1141.
- **Yayanos A. A., Dietz A. S. and Van Boxtel R. (1979).** Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. *Science*, 205:808-810.
- **Yayanos A.A. (1995).** Microbiology to 10,500 meters in the deep sea. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1) :777–805.

- **Yegin. S. (2017).** Single-step purification and characterization of an extreme halophilic, ethanol tolerant and acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1 with application potential in the food industry. *Food Chemistry*, 221.
- **Yin, J., Chen, J. C., Wu, Q., & Chen, G. Q. (2015).** Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology advances*, 33(7), 1433-1442.

Z

- **Zahran, H. H. (1997).** Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biology and Fertility of Soils*, 25(3), 211–223.
- **Zhang L., Wang Y., Dai J., Tang Y., Yang Q., Luo X. and Fang C. (2009).** *Bacillus korlensis* sp. nov., a moderately halotolerant bacterium isolated from a sand soil sample in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1787–1792.
- **ZoBell C. E. et Morita R. Y.(1957).** Barophilic bacteria in some deep-sea sediment. *J. Bacterial.*, 73:563-568.