

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université MOULOUD Mammeri de TIZI-OUZOU
Faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques
Département de Biochimie et Microbiologie



Thèse de Doctorat

En Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Etude de la flore bactérienne halophile cultivable
des zones humides de Ouargla
(Algérie)**

Présentée par : Mme KHALLEF Sakina

Soutenue publiquement le 17 / 01 / 2019

Devant le Jury

Président	DJENANE Djamel	Professeur : UMMTO
Directeur de thèse	HOUALI Karim	Professeur : UMMTO
Examineurs	KEBBOUCHE GANA Salima	Professeur : Université de Boumerdes
	KHENCHOUCHE Abdelhalim	Maitre de conférences A : Université de Sétif
	BOUMENDJEL Mahieddine	Maitre de conférences A : Université d'El Taref

REMERCIEMENTS

« Al hamdo li Allah » profondément pensé et ressenti, Al Hamdo li Allah pour l'infinité de belles choses qu'il m'a accordé et pour avoir illuminé mon chemin et soutenu mes pas.

Ce travail est l'aboutissement d'un long chemin au cours duquel j'ai bénéficié de l'encouragement et du soutien de plusieurs personnes. Que toutes les personnes physiques ou morales citées ci-après voient par-là l'expression de ma profonde gratitude !

Mes sentiments de gratitude vont en premier lieu à mon directeur de thèse, Pr HOUALI Karim, UMMTO. Ce fut une expérience très riche d'effectuer ce travail de recherche sous sa direction. Je lui suis profondément reconnaissante pour son appui et ses encouragements, qui m'ont beaucoup édifié, son savoir et son savoir-faire étaient présents à l'appel. Il a accompagné avec beaucoup de patience et de pertinence l'aboutissement de ce travail, qu'il soit assuré de mon profond estime et respect.

Je tiens à remercier Mr le Pr DJENANE Djamel UMMTO, Mme le Pr KEBBOUCHE GANA Salima université Boumerdas, ainsi que Mr KHENCHOUCHE Abdelhalim (M.C.A) l'université de Sétif, et Mr BOUMENDJEL Mahieddine (M.C.A) université d'El.Taref. Vous avez eu l'amabilité de siéger à ce jury, et accepté de porter un œil scientifique sur ce travail de thèse. C'est pour moi un grand honneur. Qu'il me soit permis de vous exprimer mon grand estime et ma considération distinguée.

J'assure de ma profonde reconnaissance Mr Hanny Myllykallio et Mme Roxane Lestini, du laboratoire d'optique et biosciences (LOB) Paris- France, pour avoir accepté de m'accueillir au sein de LOB malgré leurs nombreuses sollicitations, je les remercie vivement pour cette collaboration fructueuse.

Il m'est agréable d'évoquer l'appui moral ainsi que la sollicitude trouvée auprès de Mr Joachim Arndt-Jeamart Narbonne-France, son attention aiguë aux tous petits détails, m'ont beaucoup aidé dans l'achèvement d'une partie de ce travail. Chokran

Je tiens tout particulièrement à remercier Mme le Pr Chafia Touil Boukoffa (USTHB), qui a toujours été à l'écoute. Je suis très sensible Madame à vos qualités humaines et votre bonté.

Mon inlassable amie et complice; Chenini Keltouma, mes chères Smara Ouanissa et Ghania, merci d'être toujours à mes côtés.

Mes amis de toujours ; Dr Mansouri Rokaya CHU Annaba, Dr H.Abdesmed, Mr et Mme Djemil Faculté de Médecine Annaba, Mr A. Kiouas-CHU Constantine et Mr B. Legseir, Université d'Annaba.

Mes remerciements infinis à mes collègues de l'ITAS- Ouargla, pour les relations amicales, conviviales et fraternelles qu'ils ont su tisser au fil des années; sœurs et frères: Mmes O. Djeroudi, S. Bissati, K. Maane, S. Baba Hani, D. Rezagui, K. Ben Brahim S. Boujenah, S. Kaci ainsi que Messieurs I. Berkal, H.Senoussi, A.Chehema et B. Bouchekima, qui m'ont toujours soutenu et éclairé à tout point de vue et à tout moment.

Je remercie également Mr A.Chaabena, pour son aide précieuse et sa promptitude à répondre à toutes mes sollicitations, ainsi que Mr A.Eddoud, Mr Bouzid, Mr A.E. Idder, Mr R. Korichi,

Mr Daddi Bouhoune, Mr Guezoul, Dr Trad, Mme F.Hafiane, Mme S. Yacine, Mme S.Idder et tous mes collègues du laboratoire Bio ressources.

Je remercie tout particulièrement Mr Benaceur et Mr T.Idder (ONA –Ouargla), Mr S. Ben Hamida (ANRH-Ouargla) ainsi que Mme Z. Messai (ANRH-Ouargla), pour son appui durant toute la période d'échantillonnage et d'analyses physico-chimiques. Je vous suis si reconnaissante.

J'adresse mes remerciements au Pr D.Boutoutaou, pour sa disponibilité inconditionnelle, son regard sur certains points m'a été d'une grande aide pour préciser et affiner certaines données.

Je réserve une grande gratitude à Mr I.E.Nezli, qui a revu avec attention la partie géochimie sol et eau et m'a beaucoup donné, au-delà de ce que je pouvais attendre. Qu'il en soit infiniment remercié.

Ma profonde amitié s'adresse également à l'équipe LBE-INRA Narbonne France ; J.J.Godon, Véronique Maugenet, Nadine Lethin, Anais Bounafous et Amandine Kales. Au-delà de cela, vous avez toujours été particulièrement présents à toutes les étapes difficiles de mon parcours, vos encouragements et votre appui ont, sous diverses formes accompagnés mes pas. Que vous trouviez tous ici l'expression de ma reconnaissance!

Mes sincères et profonds remerciements vont à Dr Anatalia Poli et Dr Ilaria Finore de l'Institut de chimie biomoléculaire (ICB)-Italie, pour leur disponibilité et leur précieuse aide.

Je ne manquerai pas de remercier Mme K.Kharroub, Mme Nateche Farida et Mme Amarouche-Yala Samia qui ont tant de fois éclairé ma lanterne.

Je ne sais comment exprimer ma gratitude au directeur du laboratoire de Contrôle de Qualité-Annaba, Mr Hammadi, ainsi que Melle Nadia Boughrara chef de service de Microbiologie et tout le personnel du laboratoire, pour leurs encouragements et leur assistance aussi bien matérielle que morale.

Mes sincères remerciements, amitiés et gratitude à mes collègues du laboratoire LABAB-UMMTO, pour leur sympathie et leur chaleureux accueil.

« Qui vit sans ami(e)s disparaît sans témoins »

Merci à vous tous.

Dédicaces

A la mémoire de « mes parents », mes premiers maîtres qui m'ont donné la vie en me donnant de leur savoir, qui m'ont appris à honorer la science et à l'élever au-dessus de tout obstacle.

Vous avez été les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais...

A la mémoire de mon frère Zine Eddine, la brise de gaieté et de gentillesse

A mes sœurs ; lumière de mes jours vous êtes tout pour moi ! L'inépuisable source d'affection, le soutien quotidien indéfectible, vous m'avez redonné le courage de me relever et d'aller de l'avant. Toute ma gratitude.

A mes adorables frères ; neveux et nièces.

A Mr Boucherbat Hamza, qui n'a cessé d'être présent.

Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez tous cessé de formuler dans vos prières.

Résumé

Les milieux hypersalins, représentés par les chotts, sebkhas et sols salins, sont un exemple typique d'environnements extrêmes abritant une flore microbienne particulièrement intéressante.

Dans ce travail une approche physico-chimique combinée aux méthodes culturales et moléculaires a été appliquée à la recherche d'halobactéries, dans les échantillons de sédiments et de saumures prélevés de deux sebkhas: Oum Eraneb et Ain El Beida, situées à Ouargla, dans le Sahara Algérien.

Les résultats d'analyses ont en effet révélé que ces milieux inhabituels offrent des conditions d'aridité, d'alcalinité et d'abondance en sel, aussi bien au niveau des saumures (128 et 165g /l), qu'au niveau des sédiments (1.71% et 2.26%).

L'exploration microbienne de ces écosystèmes particuliers s'est avérée fructueuse. Des souches archéennes et bactériennes halophiles ont été isolées, purifiées et caractérisées. Les souches archéennes appartiennent à la famille des Halobacteriaceae l'ordre des Halobacteriales. Halophiles extrêmes, aérobies, à Gram négatif, ces souches sont alcali-thermotolérantes. L'étude phylogénétique a révélé leur affiliation aux genres *Natronorubrum* et *Halorubrum*.

La souche bactérienne, aérobie, se présente sous forme de bâtonnets à Gram positif, halotolérante extrême, mésophile et alcaliphile. L'analyse comparative des séquences du gène de l'ARNr 16S, a confirmé son étroite parenté (96%) au genre *Alkalibacillus*.

Certes identifiée en Chine et en Inde, notre étude est la première à rapporter la présence des espèces *Halorubrum litoreum* de *Natronorubrum bangense* ainsi que l'*Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5 dans des dépressions salées du Sahara algérien.

Mots clés: Milieu hyper salin, Sebkha, halophile extrême, Archaea, phylogénie, Sahara algérien.

Summary

Hypersaline environments such as chotts, sebkhas and salty soils are typical examples for extreme habitats which lodge an interesting microbial flora.

In this work, a physicochemical approach combined with culture and molecular methods has been adopted in search of halobacteria in both sediment and brine samples of two sebkhas, Oum Eraneb and Ain el Beida, situated near Ouarglah in the Algerian Sahara.

The results of analyzes revealed that these unusual environments offer the characteristics of aridity, alkalinity and high level of salt contents in the brines (128 and 165 g/l) as well as in the sediments (1.71% and 2.26%).

The microbiological investigation of these particular ecosystems turned out to be profitable. Halophilic strains of archaea and bacteria have been isolated, purified and characterised. The archaean strains belong to the family *Halobacteriaceae*, order *Halobacteriales*. Extremely halophilic, aerobic, Gram negative, these strains are alkali-thermotolerant. The phylogenetic examination has revealed them to belong to the genera *Natronorubrum* and *Halorubrum*.

The bacterial strain showed aerobic, Gram positive, extremely halotolerant, mesophilic and alkalophilic rods. The comparative analysis of the 16S rRNA gene sequence showed its close proximity (96%) to the genus *Alkalibacillus*.

Already identified in China and India, our study remains the first report of the presence of *Halorubrum litoreum*, *Natronorubrum bangense* and *Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5 in salt depressions in the Algerian Sahara.

Keywords: hypersaline environments, sebkha, extremely halophilic, archaea, phylogeny, Algerian Sahara.

ملخص

الايوساط الفائقة الملوحة، المتمثلة في الشطوط والسبخات، والترية المالحة، هي نموذج للبيئات المتطرفة التي تؤوي مجمع من الميكروبات المثيرة للاهتمام بشكل خاص.

في هذا العمل تم تطبيق نهج الفيزيائية جنباً إلى جنب مع الأساليب الزراعية والجزئية للحصول على *Halobacteria*، في عينات من الرواسب والمياه المالحة التي تم جمعها من سبختين: أم الرانوب وعين البيضاء الواقعتين في ورقلة بالصحراء الجزائرية.

وقد كشفت نتائج الفحص أن هذه البيئات غير عادية وتوفر ظروف جفاف، قلوية ووفرة في الملوحة، سواء في الاملاح (128 و 165 / غلتر)، او على مستوى الرواسب (1.71% و 2.26%).

لقد كان الاستكشاف الميكروبي لهذه الأنظمة البيئية الخاصة ناجحاً. وقد تم عزل و تنقية وتمييز السلالات البيولوجية الهالوفيلية. تنتمي السلالات "archéennes" إلى عائلة *Halobacteriaceae* المنتسبة الى رتبة « *Halobacterial* » ذات الملوحة المتطرفة، الهوائية النمط، *Gram négatif*، هذه السلالات قلوية متحملة للحرارة. كشفت الدراسة الفيلوجينية عن انتمائها إلى أجناس *Natronorubrum* و *Halorubrum*.

أما السلالة البكتيرية الهوائية النمط والتي تظهر على شكل عصيات، ذات *Gram positif*، *halotolerante* شديدة شديدة التحمل للملوحة، متوسطة التحمل للحرارة و محبة للوسط القلوي، أكد التحليل المقارن لمتواليات الجين *16S rRNA* تقاربها ب(96%) تشابه مع جنس *Alkalibacillus*.

مع أنها هذه السلالات حددت بالتأكيد في الصين والهند إلا أن دراستنا هي الأولى التي أبلغت عن وجود الاجناس

في المنخفضات المالحة بالصحراء الجزائرية. *Natronorubrum bangense*، *Halorubrum litoreum* و *Alkalibacillus haloalkaliphilus C-5*

الكلمات المفتاحية: وسط مفرط الملوحة، سبخة، هالوفيل شديد، الفيلوجيني، Archaea، الصحراء الجزائرية

Sommaire

Sommaire	
Liste des figures	
Liste des tableaux.....	
Liste des annexes	
Introduction	1

Chapitre I: Synthèse bibliographique

1. Le monde des extrémophiles	6
2. Diversité des milieux extrêmes.....	7
2.1. Les milieux hypersalés et l'halophilie.....	7
2.2. Les milieux à hautes températures et la thermophilie.....	8
2.3. Les milieux alcalins et l'alcalophilie.....	9
2.4. Les milieux acides et l'acidophilie.....	10
2.5. Microorganismes piézophiles (barophiles)	11
2.6. Diversité des microorganismes halophiles.....	12
3. Les microorganismes poly extrémophiles	15
4. Origine des environnements hyper salins	16
5. Physico-chimie des environnements hypersalins	18
6. Mécanismes d'adaptation des bactéries halophiles	21
6.1. L'osmorégulation	21
6.2. Mécanisme type KCl ou Halobacterial	23
7. Diversité phylogénétique	30
7.1. Archaea halophiles :	30
7.2. Eucaryotes halophiles :	38
7.3. Bactéries halophiles :	38

7.3.1. Phylum Proteobacteria :	38
7.3.2. Phylum Firmicutes :	39
7.3.3. Phylum Actinobacteria :	39
7.3.4. Phylum Spirochètes :	39
7.3.5. Phylum Bacteroidetes :	40
8. Usages biotechnologiques.....	40

Chapitre II: Matériel et méthodes

1. Présentation de la région d'étude.....	45
1.1 Localisation géographique :	45
1.2. Concepts des <i>Chotts</i> et <i>Sebkhas</i>	45
2. Prélèvement des échantillons.....	47
3. Analyses physico-chimiques :	48
4. Recherche des bactéries halophiles cultivables	51
4.1. Isolement, purification et conservation des souches	51
4.2. Caractérisation phénotypique.....	53
4.3. Etude Physiologique.....	53
4.4. Métabolisme respiratoire.....	54
4.5. Sensibilité aux antibiotiques	57
5. Caractérisation phylogénétique.....	58

Chapitre III: Résultats et discussion

1- Les conditions climatiques	60
1-1-La température.....	60
1.2. La pluviométrie	60
1.3. L'évaporation	60
1.4. L'humidité de l'air	61

2. Analyses physicochimiques des saumures et sédiments des deux <i>sebkhas</i>	61
2.1. Diagramme de Piper.....	68
2.2. Analyses statistiques	73
3. Caractérisation microbiologique des isolats	78
3.1.. Propriétés microbiologiques	78
3.1.1. Croissance et propriétés cellulaires	78
3.1.2. Caractéristiques physiologiques et phénotypiques	80
3.1.3. Résultats de l'antibiogramme	89
3.2. Discussion	89
Conclusion	110
Références bibliographiques.....	114
Annexes	135

Liste des figures

Figure 1 : Cascade du site thermal Hammam Debagh-Algérie (a); Piscines du site thermal Pamukkale (château de coton)-Turkie (b).	8
Figure 2 : Cheminée hydrothermale d'anhydrite sur Rainbow, dorsale Médio-Atlantique	9
Figure 3: Le fleuve de Rio Tinto-Espagne.....	11
Figure 4: Chott Melghir, El Oued-Algérie.....	17
Figure 5: Habitats thalassohalins : Marais salants de Costa Blanca en Espagne (a), le Grand Lac Salé Utah aux USA (b), Lac de saumure au fond de la Méditerranée -Est (©Ifremer) (c). Habitats athalassohalins : Lac Magadi au Kenya (d), Lac Rosé au Sénégal (e-f)	19
Figure 6: Stratégie « <i>Salt-in</i> »	23
Figure 7: Effet de l'osmolarité sur la structure d'une protéine d'une Halobactérie	24
Figure 8: Stratégie « <i>Salt-out</i> »	24
Figure 9 : Représentation de la stabilisation de la structure d'une protéine d'une Halobactérie à forte osmolarité	25
Figure 10: La distribution de microorganismes halophiles dans l'arbre du vivant	31
Figure 11: Situation géographique de la wilaya de Ouargla et sites d'étude.....	46
Figure 12 : Sebkha Oum Eraneb positionnement des points d'échantillonnage (a).....	49
Figure 13 : Chott Ain El Beida positionnement des points d'échantillonnage (c)	49
Figure 14: Evaporation des deux plans d'eau-Ain El beida et Oum Eraneb (année 2013).	65
Figure 15: Variation de la concentration en éléments majeurs dans les saumures de <i>sebkha</i> Oum Eraneb : Janvier-Juin 2013.	66
Figure 16: Variation de la concentration en éléments majeurs dans les saumures de <i>chott</i> Ain El Beida : Janvier-Juin 2013	67
Figure 17: Diagramme de Piper des eaux du site 1 : <i>Sebkha</i> Oum Eraneb	69
Figure 18: Diagramme de Piper des eaux du site 2 : <i>chott</i> Ain Elbeida	70

Figure 19: Répartition des éléments majeurs dans les sédiments <i>sebkha</i>	71
Figure 20: Répartition des éléments majeurs dans les sédiments <i>chott</i> Ain El Beida	71
Figure 21: Analyse en composantes principales des paramètres physico-chimiques des saumures des deux <i>sebkhas</i>	74
Figure 22: Analyse en composantes principales des paramètres physico-chimiques des sédiments des deux <i>sebkhas</i>	76
Figure 23 : Aspects macroscopiques et microscopiques pleiomorphes des isolats (images DIC) <i>Halorubrum litoreum</i> , (a) <i>Natronorubrum bangense</i> (b) et <i>Alkalibacillus haloalkaliphilus</i> C-5 (c). Barre d'échelle 10µm (LOB).	79
Figure 24: Gel d'extraction des principales bandes après électrophorèse des produits de PCR de l'ADNr 16s des isolats, en utilisant des amorces spécifiques de l'archaeae 21F et 1404R...86	86
Figure 25: <i>Halorubrum litoreum</i> JCM 13561 ^T relations évolutives des taxons.....	87
Figure 26: Arbre phylogénétique de l'espèce <i>Natronorubrum bengense</i> A33 ^T	88
Figure 27: <i>Alkalibacillus haloalkaliphilus</i> C-5 (souche 3) relations évolutives des taxons.	88
Figure 28: Répartition mensuelle de la flore halophile isolée des saumures des deux <i>sebkhas</i>	98
Figure 29: Répartition mensuelle de la flore halophile isolée des sédiments des deux <i>sebkhas</i>	98
Figure 30: Variation de la flore halophile isolée des saumures de <i>sebkha</i> Oum Eraneb en fonction de la composition en sel	99
Figure 31: Variation de la flore halophile isolée des saumures de <i>Chott</i> Ain El Beida en fonction de la composition en sel	100
Figure 32: Influence du pH sur la répartition de la flore halophile isolée des saumures-Site 1 : Oum Eraneb	101
Figure 33: Influence du pH sur la répartition de la flore halophile isolée des saumures- site 2 : Ain El Beida.....	101

Figure 34: Répartition de la flore halophile isolée des sédiments- <i>Sebkha</i> Oum Eraneb.	102
Figure 35: Répartition de la flore halophile isolée des sédiments- <i>Chott</i> Ain El Beida.....	102
Figure 36: Résultats de l'antibiogramme des souches isolées : <i>Natronorubrum bengense</i> (a) ; <i>Halorubrum litoreum</i> (b) et <i>Alkalibacillus haloalkaliphilus</i> C-5(c).....	105
Figure 37: Récapitulatif des résultats des trois méthodes de calcul montrant l'écart d'estimation de l'évaporation	137
Figure 38: Aspects des cultures à différentes températures d'incubation	144
Figure 39: Croissance des isolats sur milieux de culture à différentes teneur en sel.....	145
Figure 40 : Croissance des isolats sur des milieux à différents pH	146
Figure 41: Résultats de l'antibiogramme des souches isolées	151
Figure 42: Aspects des cultures sur milieux à différentes concentrations de Mg^{2+}	153

Liste des tableaux

Tableau 1. Catégories de micro-organismes halophiles..	13
Tableau 2 : Conditions extrêmes et microorganismes appropriés.	15
Tableau 3: Composition chimique de milieux hypesralés thalassoalins et athalassoalins	20
Tableau 4 : Solutés compatibles accumulées par les microorganismes halophiles.	26
Tableau 5 : Environnements athalassoalins et diversité microbienne.	33
Tableau 6: Localisation des points de prélèvements au niveau des deux sites	48
Tableau 7 : Evaporation du plan d'eau des deux sebkhas (Année 2013)	61
Tableau 8 : Propriétés physico-chimiques de sebkha Oum Eraneb et Ain El Beida comparés à d'autres écosystèmes salés terrestres et marins ^a	64
Tableau 9 : Classification des sols suivant la CE et la teneur totale en sel.	72
Tableau 10 : Répartition de l'inertie entre les axes	74
Tableau 11: Matrice de corrélation des paramètres physico-chimiques des saumures des sebkhas.	75
Tableau 12 : Répartition de l'inertie entre les axes	76
Tableau 13: Matrice de corrélation des paramètres physico-chimiques des sédiments des sebkhas	77
Tableau 14 : Caractéristiques qui différentient <i>Halorubrum litoreum</i> JCM 13561 ^T des autres espèces du même genre.	81
Tableau 15 : Caractéristiques qui différentient <i>Natronorubrum bangense</i> A33 ^T des autres espèces du genre <i>Natronorubrum</i> .	83
Tableau 16 : Caractéristiques différentiant <i>Alkalibacillus haloalkaliphilus</i> C-5 des autres espèces du même genre.	84
Tableau 17: Exemples d'halophiles et halotolérants et solutés organiques compatibles.	135
Tableau 18 : Amorces utilisées et produits de PCR obtenus avec les différentes souches (LOB).	147

Liste des annexes

Annexe 01 : Exemples d'halophiles et halotolérants et solutés organiques compatibles.....	135
Annexe 2. Appareils de mesure et d'analyse utilisés et phase d'enrichissement	136
Annexe 3 : Calcul de l'évaporation	137
Annexe 4 : Résultats des analyses physico-chimiques et microbiologiques des différents échantillons	138
Annexe 5 : Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats	142
Annexe 6 : Croissance des isolats à différentes températures	144
Annexe 7 : Croissance des isolats à différentes concentrations de NaCl	145
Annexe 8 : Le pH de croissance des différents isolats	146
Annexe 9 : Séquençage demarche	147
Annexe 10 : Séquences des isolats	148
Annexe 11 : Effets des antibiotiques sur les souches isolées	150
Annexe 12 : Croissance à différentes concentrations de Mg^{2+}	152

Introduction

La vie habite tous lieux possibles sur Terre interagissant avec l'environnement et en lui-même (relations inter-espèces). Dans la nature, il est très rare qu'un écotope soit habité par une seule espèce. En règle générale, la plupart des écosystèmes contiennent des communautés liées fonctionnellement (**Pikuta et al., 2007**).

Au cours de l'évolution de la Terre, un certain nombre d'écosystèmes ont été formés. Ces écosystèmes diffèrent par la grande variété des facteurs physico-chimiques et biologiques qui composent notre environnement. Traditionnellement, le pH et la salinité sont considérés comme des extrêmes géochimiques, par opposition à la température, la pression et le rayonnement que l'on appelle les extrêmes physiques (**Van den Burg 2003**).

Qu'entend-on nous par milieu extrême ? À cette question simple, les réponses ont varié selon les époques. Il s'agit tout d'abord de milieux hostiles à l'homme et où toute vie humaine paraissait impossible. Cette conception a laissé place à une approche basée sur l'observation des formes de vie macroscopique. Puis, au cours de la seconde moitié du XXe siècle, l'inventaire des formes de vie a permis la découverte de micro-organismes vivant dans des milieux de plus en plus improbables considérés auparavant comme stériles : sources thermales, hydrothermales, lacs acides, alcalins, hypersalés, sédiments marins profonds, réservoirs pétroliers, glaciers etc. Ces découvertes ont progressivement reculé les limites physiques et chimiques connues de la vie sur Terre. À l'heure actuelle, certaines limites ne sont toujours pas déterminées et les recherches se poursuivent.

Les études phylogénétiques basées sur l'analyse de l'ARN ribosomal 16S ont permis de mettre en évidence l'existence de trois domaines distincts : les bactéries (ou *Bacteria*), les archées (*Archaea*) et les eucaryotes (*Eukarya*). Bien qu'établie dès 1978 par le microbiologiste américain Carl Woese, cette classification du vivant ne s'est imposée que très lentement, car il a été difficile d'imaginer l'existence d'organismes vivants dans les conditions très hostiles (**Perry et al., 2004**).

Le terme « **extrémophiles** » a été évoqué pour la première fois, en 1974, par Mac Elory, dans un journal intitulé '*Some comments on the evolution of extremophiles*', il a été interprété de plusieurs façons pour enfin être associé aux microorganismes qui peuplent des niches écologiques extrêmes caractérisées par des conditions défavorables pour le développement d'une vie (**Irwin et Baird, 2004**).

La plupart des extrémophiles se trouvent dans le monde microbien et la gamme des extrêmes environnementaux tolérés par les microorganismes est beaucoup plus large que les autres formes de vie (**Satyanarayana et al., 2005**).

Selon les conditions extrêmes auxquels les microorganismes extrêmophiles sont confrontés, ils peuvent être thermophiles, halophiles, psychrophiles, alcalophiles, acidophiles et piézophiles (**Irwin et Baird, 2004**).

Le concept d'extrêmophile a été forgé à partir des travaux de microbiologistes. La découverte des bactéries thermophiles est généralement attribuée à Miquel (1888), mais Brewer (1866) avait déjà décrit les Chlamydo-bactériales thermophiles des geysers de Californie.

Brock découvrit à la fin des années soixante, les premières espèces se développant à des températures de l'ordre de 70°C dans des sources thermales du parc de Yellowstone aux États-Unis. En 1969, il isola *Thermus aquaticus* qui sera à la base de la découverte des ADN polymérase thermostables. À la même période, Horikoshi, au Japon, mettait en évidence l'existence de microbes ne se développant qu'à des pH alcalins et passés presque totalement inaperçus auparavant. Des espèces hyperacidophiles du genre *Picrophilus* poussant à des valeurs de pH bas ont été décrites par **Schleper et al. (1996)**.

Puis les microbiologistes allemands W. Zillig et K. Stetter allaient donner une impulsion déterminante en explorant systématiquement les milieux extrêmes de la planète, avec une prédilection marquée pour le chaud et la mise en évidence d'espèces ayant un optimum de croissance supérieur à 100 °C. *Pyrolobus fumari* est notamment capable de survivre à 121°C. De ces travaux et de ceux consacrés à d'autres types d'environnements émergea le concept d'extrêmophile.

Exceptionnels, les « **extrêmophiles** » défient les lois de la biologie et créent la vie là où l'homme n'osait l'imaginer (**Echigo et al., 2005**). Ces microorganismes ne sont pas seulement tolérants à ces conditions extrêmes, mais celles-ci sont requises pour leur croissance et développement (**Pikuta et al., 2007**).

Ainsi la vie subsiste sur toute la gamme des concentrations de sel rencontrées dans les habitats naturels et anthropiques. Les environnements hypersalins sont des habitats extrêmes dans lesquelles plusieurs facteurs, en plus de la teneur élevée en sel, peuvent limiter la croissance des organismes. Ces facteurs comprennent la température, le pH, la pression, l'oxygène, la disponibilité en nutriments et les radiations solaires (**Rodriguez-Valera, 1988**).

Ces environnements ont une distribution cosmopolite sur notre planète, représentés par les systèmes aquatiques, en particulier les lacs salés, ainsi que les sols salins (**Rodriguez-Valera, 1988; Oren, 2002a, b; de la Haba et al., 2011**).

Malgré cette salinité extrême, les environnements hypersalins naturels et artificiels abritent des densités cellulaires microbiennes remarquablement élevées et diverses (**Oren, 2000**).

Les microorganismes qui vivent dans ce type d'habitats sont appelés halophiles (organismes aimant le sel). Les halobactéries sont les organismes les plus halophiles connus qui forment la population microbienne dominante lorsque les eaux hypersalines approchent de la saturation (~ 35% p/v) (**Rodriguez-Valera et al., 1981**), donnant souvent une coloration rouge aux saumures que les Chinois ont noté, dès l'an 2500 av. J.-C. Ces organismes atteignent des densités élevées (~ 10^8 cellules/ml).

L'existence de la vie dans les écosystèmes extrêmes a conduit à s'interroger sur les stratégies et les mécanismes cellulaires, moléculaires et génétiques mis en jeu par ces microorganismes atypiques pour se maintenir dans de tels milieux. La mise en évidence d'une extraordinaire biodiversité de ces formes de vie montre que l'inventaire de toutes les espèces vivantes sur terre n'est pas prêt d'être fini.

L'étude de la biodiversité microbienne des écosystèmes algériens comme les *chotts* hypersalés (*Sebkhas*), les sources hyperthermales, les eaux de gisement de pétrole et les eaux prélevées au niveau des zones arides et semi-arides a révélé la présence de nouveaux groupes microbiens très particuliers.

En effet ; lors de l'étude de la biodiversité procaryote du lac salé d'El Goléa, au Sahara algérien, des microorganismes extrêmement halophiles ont été isolés du site contenant 290g/l de NaCl (**Hacène et al., 2004**). En se penchant sur sebkha Ezzemoul, **Kharroub et al. (2007)** révéla au jour de nombreuses espèces archéennes et bactériennes halophiles dotées d'activités hydrolytiques. Sur la même lancée, d'autres travaux comme ceux de **Boutaiba et al. (2011)**, **Klouche et al. (2013)** et **Imadalou Idress et al. (2013)** se sont succédés en mettant en évidence de nouvelles espèces.

Les milieux hypersalins sont nombreux en Algérie, plusieurs d'entre eux sont considérés comme zones humides et classés sites Ramsar. De nombreuses études ont porté sur ces milieux mettant en avant leur diversité faunistique et floristique. Cependant, l'étude de ces milieux du point de vue diversité microbienne a été peu explorée.

Au vu des connaissances actuelles, aucune recherche de flore bactérienne halophile n'a été réalisée sur les *sebkhas* Oum Eraneb et Ain El Beida, dans le désert du Sahara situé à Ouargla, à 800 km au sud-ouest de la capitale, Alger.

Nous nous sommes donc attachés au cours de ce travail à appréhender la microflore bactérienne halophile ‘inhabituelle’ dans ces habitats inhabituels.

Dans un premier temps les échantillons de saumures et de sédiments prélevés des deux sites étaient soumis à des analyses physico-chimiques, afin de déterminer d’une part le faciès chimiques des eaux prélevés et de voir, d’autres part, la répartition des éléments majeurs dans les sédiments.

Dans un second temps, l’identification des isolats, a suivi une approche polyphasique en combinant une caractérisation morphologique, physiologique, biochimique et moléculaire.

Le premier chapitre de ce travail présente une synthèse bibliographique des données actuelles sur les microorganismes extrémophiles et halophiles, tant au niveau écologique que taxonomique en insistant sur la biodiversité des environnements hypersalins. Une documentation des mécanismes d’adaptation à la vie extrême est également présentée.

Après une description des différentes méthodes de culture et d’analyse utilisées au cours de ce travail (deuxième chapitre), nos résultats ont été divisés en deux parties (troisième chapitre). La première partie rapporte la composition physicochimique des saumures et sédiments, la deuxième discute les résultats de la caractérisation microbiologique des souches isolées les comparant aux données bibliographiques. Une conclusion générale qui reprend les principaux résultats et perspectives escomptés par la présente étude.

*Synthèse
bibliographique*

1. Le monde des extrémophiles

Les environnements normaux, sont ceux dont les facteurs physico-chimiques les plus importants se situeraient approximativement à des valeurs de température de 4 à 50°C, de pH supérieur à 5 et inférieur à 9, de salinité entre celle de l'eau douce et celle de l'eau de mer (3,5%, p/v) et de pression inférieure à 20 MPa. Loin de ces valeurs, le stress environnemental augmente et la diversité des espèces diminue (**Kristjansson et Hreggvidsson, 1995**). Un environnement est considéré 'extrême' si ses facteurs physiques ou chimiques sont situés en dehors de la gamme des environnements qualifiés de normaux (**Albers et al., 2001**).

L'extrémophilie est la capacité de certains microorganismes à se développer dans des conditions physiques et chimiques défavorables pour la plupart des organismes vivants (**Lefebvre, 2005**). Le concept d'extrémophilie, à la différence de celui de résistance aux conditions extrêmes, implique que l'ensemble de la machinerie cellulaire soit adapté aux conditions extrêmes et que les cellules fonctionnent de manière optimale dans ces conditions (**Gueznec et al., 2010**).

Les premiers microorganismes extrémophiles isolés font partie des halophiles (du grec *halo*, sel). Ces derniers vivent dans des concentrations en sels très élevées et ont été découverts dans un environnement qu'on croyait dépourvu de vie : la Mer Morte. Une découverte qui n'a retenu l'attention des chercheurs qu'après l'instauration par **Woese et Fox (1977)** du 3^{ème} domaine du vivant, celui des *Archaea*, auxquels ils appartiennent.

Ce groupe de procaryotes atypiques dévoile ses capacités à vivre dans les conditions extrêmes. Ils sont en effet présents dans les marais salants (**Baliga et al., 2004**), les zones arides et acides (**Futterer et al., 2004**) ou encore dans les lacs gelés de l'Antarctique (**De Long et al., 1994**). On le trouve aussi dans les environnements thermophiles et hyperthermophiles regroupant des espèces physiologiquement diverses telles que les *Methanoarchaea* productrices de méthane (**Huber et al., 1982; Takai et al., 2004b**), les chimioorganotrophes et les espèces sulfito-réductrices, c'est également le cas des espèces du genre *Archaeoglobus* (**Henstra et al., 2007**).

Le terme extrémophile est le plus souvent employé pour rapporter des microorganismes procaryotes, puisque la majorité appartient au domaine des *Archaea*.

La découverte de ces microorganismes a dès lors déclenché une sorte de chasse aux extrêmophiles, qui a abouti en quelques années, à la découverte d'une diversité inouïe, complètement inattendue, de microorganismes retrouvés dans des milieux supposés hostiles à la vie (**Mesbah et Wiegel, 2008**).

2. Diversité des milieux extrêmes

Différents milieux extrêmes existent, ces biotopes naturels peuvent être reconnus quand un de ces facteurs physiques (pression, température...), ou chimiques (acidité, salinité ...) se trouve dans l'extrême de la gamme.

2.1. Les milieux hypersalés et l'halophilie

Les milieux hypersalés ou sursalés sont ceux dont la teneur en sels dissouts est supérieure à celle de l'eau de mer (35g/l) (**Satayarayana et al., 2005**). Parmi ces milieux, on retrouve divers lacs continentaux des zones désertiques ou subdésertiques, des lagunes maritimes et des marais salants (**Pipkin et al. 1977**). Lorsqu'on dépasse les 100g/l en sels, les milieux deviennent extrêmes et inhibent la croissance d'une grande majorité des microorganismes (**Rodriguez-Valera, 1988**).

Les plus importants écosystèmes hypersalés étudiés jusqu'à présent regroupent le Grand Lac Salé dans l'Ouest des Etats Unis, la Mer Morte au moyen Orient, le Lac de Magadi au Kenya ainsi que les saumures extrêmement alcalines de Wadi Natrun en Egypte (**Rappé et Giovannoni 2003**). Les sols salins et les aliments salés sont également des habitats des microorganismes halophiles et halotolérants (**Modigan et Oren, 1999**).

Cependant, dans ces environnements où la concentration en sel est proche de la saturation, nichent des communautés denses de microorganismes halophiles (**Rappé et Giovannoni 2003**). En raison de l'absence de la prédation et de la teneur élevée en nutriments, des densités de 10^7 - 10^8 cellules/ml et plus ne sont pas rares (**Oren, 2002**).

Le mot halophile composé de « hals » qui signifie sel et « phil » aime, de ce fait les microorganismes halophiles sont définis comme étant des organismes qui requièrent du sel pour leur croissance (**Ebel et al., 2004**). Qualifiées de bactéries extrêmes, elles peuplent de façon quasi-exclusive les marais salants, les lacs salés et les mines de sel où la salinité est bien supérieure à celle des océans (**Leclerc et Mossel, 1989 ; Ventozaet Nieto, 1995**).

Plusieurs espèces ont été retrouvées dans ces écosystèmes, malgré la faible diversité taxonomique qui leur est attribuée (Oren, 1994 ; Kamekura, 1998 ; Grant W-D, 1998).

La plupart de ces microorganismes halophiles ont une teneur élevée en pigments, c'est pour cette raison que les eaux du Grand Lac salé Utah, les étangs cristalliseurs des marais salants solaires et le Lac Magadi (Kenya) sont souvent de couleur rouge-vif, les eaux rouges sont mêmes parfois trouvées dans la Mer Morte (Oren, 2002).

2.2. Les milieux à hautes températures et la thermophilie

La vie aux températures élevées est désignée en termes de thermophile ou hyperthermophile. Les microorganismes thermophiles se développent à des températures relativement élevées, entre 45°C et 80°C. Les hyperthermophiles sont des thermophiles particulièrement extrêmes pour lesquelles les températures optimales sont au-dessus de 80°C (Madigan et Martino, 2006), telles que les bactéries, *Thermotoga maritima* et *Aquifex pyrophilus* qui croissent à des températures de 90°C et 95°C respectivement (Niehaus *et al.*, 1999).

Ces micro-organismes sont retrouvés dans écosystèmes qui peuvent avoir une origine géothermique terrestre, liée généralement à une activité volcanique (Figure 1). C'est le cas des sources chaudes localisées en Islande, en Afrique ou dans le Parc National de Yellowstone en Amérique du Nord.



Figure 1 : Cascade du site thermal Hammam Debagh-Algérie (a); Piscines du site thermal Pamukkale (château de coton)-Turkie (b). (<https://www.opodo.fr/blog/spa-sources-chaudes.html>).

Soit une origine hydrothermale océanique profonde : le fluide hydrothermal jaillit au niveau du plancher océanique au travers de fumeurs noirs et sort à des températures pouvant atteindre 400°C (Figure 2). Les hyperthermophiles les plus extrêmes sont des *Archaea*, appartenant aux genres *Pyrobaculum*, *Pyrodictium*, *Pyrococcus* et *Methanopyrus* (Stetter, 1996). *Archaea Pyrococcus abyssi* ou « la boule de feu des abysses » collectée au niveau d'une cheminée de source hydrothermale à 2000 m de profondeur au Nord du bassin Fidjien dans l'Océan Pacifique, affiche un optimum de croissance à 96°C (Erauso *et al.*, 1993).



Figure 2 : Cheminée hydrothermale d'anhydrite sur Rainbow, dorsale Médio-Atlantique (©Ifremer) 2010.

La base moléculaire pour l'adaptation à ces environnements extrêmes a été étudiée de manière intensive. À des températures élevées, des biomolécules, telles que les enzymes se dénaturent et perdent leur fonction induisant l'arrêt du métabolisme. En outre, la fluidité des membranes augmente de façon significative, ce qui perturbe la cellule.

Les thermophiles s'y adaptent grâce à leurs lipides membranaires, qui contiennent des acides gras saturés et linéaires leur fournissant le bon degré de fluidité nécessaire pour le fonctionnement des membranes, ce qui n'est pas le cas des mésophiles (Ulrih *et al.*, 2009).

2.3. Les milieux alcalins et l'alcalophilie

Les alcalophiles sont des microorganismes qui se développent à des valeurs de pH égales ou supérieures à 9,0, avec un pH optimum entre 10 et 12 (Horikoshi, 1999). Parmi les lacs de soude les plus stables et productifs se hisse le Lac Magadi au Kenya, avec des valeurs de pH supérieures à 10 atteignant parfois 12 (Jones *et al.*, 1998).

Des communautés microbiennes, qui prolifèrent à un pH de 12,9, ont été isolées des lacs de soude de Maqarin, en Jordanie (**Pedersen *et al.*, 2004**).

Les alcalophiles sont souvent isolés de milieux naturels qui ont également tendance à avoir des concentrations élevées en chlorure de sodium (NaCl) ; ceux-ci sont ainsi appelés haloalcalophiles (**Gareeb et Setati, 2009**). Quant aux thermo-alcalophiles, ils requièrent un pH alcalin pour leur croissance optimale et une température supérieure à 50°C.

En ce qui concerne les environnements alcalins salés à fortement salés, ce sont des bassins fermés où la vitesse d'évaporation est élevée et permet d'atteindre une salinité de 35% en NaCl pour des pH compris entre 8 et 12. Ces lacs aux couleurs pouvant aller du vert au rouge, en passant par le rose ou l'orange, se retrouvent sur les tous les continents.. La diversité microbienne retrouvée dans ces environnements est très variée mais les bactéries haloalcalophiles les plus étudiées sont les cyanobactéries filamenteuses (*Spirulina, Anabaenopsis et Arthrospira*) ; et les bactéries pourpres anoxygéniques (*Ectothiorhodospira et Halorhodospira*) (**Gregoire *et al.*, 2009**).

Dans des conditions alcalines, les concentrations des ions d'hydrogène sont très faibles et les cellules ont des difficultés à produire de l'énergie. Pour contourner ces problèmes, les microorganismes pompent ces ions et exportent d'autres afin de maintenir leur intérieur à proximité de la neutralité (**Horikoshi, 2006**).

Les microorganismes présents dans ces milieux jouent un rôle important dans la reminéralisation de la matière organique au sein de l'écosystème. Ils sont les principaux contributeurs à la transformation du carbone organique, du soufre et des composés azotés. Ils ont aussi un rôle important dans les cycles des éléments nutritifs (**Sarethy *et al.*, 2011**).

2.4. Les milieux acides et l'acidophilie

Les acidophiles sont des microorganismes qui se développent de façon optimale à un pH de 2,0 (**Morozkina *et al.*, 2010**), et qui existent dans les trois domaines de la vie (**Baker-Austin et Dopson, 2007**). Les acidophiles oxydent le soufre élémentaire (dans les zones volcaniques) ou les minéraux sulfurés pour obtenir de l'énergie, générant ainsi des milieux acides extrêmes (**Rohwerder et Sand, 2007**).

Les environnements où sont retrouvés les micro-organismes acidophiles sont souvent riches en métaux lourds (fer, arsenic, cuivre, zinc, chrome...etc.). L'écosystème acide le plus étudié est le fleuve Río Tinto (fleuve de sang), en Espagne, d'une longueur de 100 km (Figure 3), avec un $\text{pH} < 2$, (dû à l'oxydation des ions sulfures en acides sulfurique), une concentration importante en métaux lourds et un surprenant niveau de diversité microbienne (**Fardeau, Gounant et al., 2005**).

Les environnements avec des conditions de pH bas sont un défi à la biochimie cellulaire car l'acidité extrême conduit à la dénaturation des protéines. Les acidophiles protègent leurs protéines en incluant les acides aminés neutres et par pompage active des protons hors de la cellule afin de maintenir les niveaux de pH intracellulaire constants (**Baker-Austin et Dopson, 2007**). Le record de l'acidophilie est atteint par l'archée thermoacidophile *Picrophilus torridus* dont l'optimum de croissance se situe à pH 0,7 et 65°C, capable de se diviser à pH 0 et dont le milieu intracellulaire est à pH 4,6. Le séquençage du génome complet de *P. torridus* a permis de rechercher les mécanismes d'adaptation à ce pH extrême (**Futterer et al., 2004**).



Figure 3: Le fleuve de Rio Tinto-Espagne (<https://www.alibabuy.com>) 2007.

2.5. Microorganismes piézophiles (barophiles)

Le terme piézophile (en Grec piezo = pression et philo = aimer) a été introduit officiellement en 1995 pour décrire les microorganismes barophiles (**Yayanos, 1995**). Les premières tentatives pour isoler les micro-organismes adaptés à croître sous des pressions élevées, remontent à 1957 (**Zobell et Morita, 1957**). Ce n'est qu'en 1979, que les premières bactéries barophiles ont été définies comme celles ayant une croissance optimale à des pressions supérieures à 40 MPa (mégapascal) (**Yayanos et al., 1979**).

Les bactéries piézophiles vivant dans des conditions abyssales océaniques (>5000 m de profondeur) sont également des bactéries psychrophiles car la température moyenne à ces profondeurs est de l'ordre de 4°C. On parle donc de bactéries piézopsychrophiles. La première bactérie piézopsychrophile isolée est la souche CNPT 3, apparentée au genre *Spirillum*, retrouvée à une profondeur de 5600 mètres. Elle se développe de manière optimale entre 2 et 4°C pour une pression de 50 MPa. Une deuxième souche, la souche MT 41 collectée à 10476 mètres de profondeur, pousse de manière optimale à 2°C et à 69 MPa (**Yayanos, 1995**).

Les sources hydrothermales océaniques profondes constituent également un habitat idéal pour les bactéries piézophiles. Situées sur les dorsales océaniques, leur profondeur varie de 800 à 4000 mètres et la gamme de température s'étend de 2°C à 350°C. On peut donc y retrouver des thermopiézophiles (**Zeng et al., 2009**).

Outre le milieu aquatique marin, il est possible de retrouver de tels micro-organismes dans les aquifères profonds, la croûte terrestre ou les réservoirs pétroliers. Parmi les représentants des piézophiles, on cite les genres : *Shewanella*, *Colwellia*, *Moritella*, *Methanococcus*, *Pyrococcus* et *Thermus* (**Abe et Horikoshi, 2001**).

D'autres microorganismes colonisent des milieux extrêmes, comme ceux capables de vivre en présence de fortes concentrations d'ions métalliques (métallophiles), à des niveaux élevés de rayonnement (radiophiles) ou en absence d'oxygène (anaérobies strictes) (**De Champdoré et al., 2006**).

2.6. Diversité des microorganismes halophiles

La capacité de ces microorganismes à se développer dans les habitats hypersalins, est une propriété captivante qui fait d'eux l'objet d'intenses recherches. Ils représentent un groupe hétérogène de microorganismes qui se retrouve dans les trois domaines : Bacteria, Archaea, et Eucarya, pouvant croître dans une large gamme de salinité difficile à déterminer, car elle est très variable et dépend des conditions de croissance (Température, pH et nutriments) (**Ventoza et al., 1982 ; Madigan et Oren, 1999, Oren, 2002**).

En 1985, Kushner a réparti les micro-organismes halophiles en différentes catégories, selon les gammes de concentrations en sel nécessaire à leur croissance (Tableau 1).

Il est important de faire la différence entre l'halophilie obligatoire et l'halo-tolérance. Le terme halophilie désigne les microorganismes nécessitant obligatoirement la présence de sel (NaCl) pour leur croissance. Ces microorganismes ont été classés par plusieurs auteurs, **Kushner (1978)**, **Larsen (1986)** et **Ramos-Cormanzana (1989)**, en trois groupes, selon la concentration en sels qui permet leur croissance optimale (**Tang et al., 2002**).

D'une manière générale, les halophiles extrêmes se développent en présence d'une concentration de sel entre 20% et 30% et exigent un minimum de 12% à 15% de sel pour la croissance (**Johnson et al., 1986a**). Les halophiles modérés ont une bonne croissance entre 3-15% (p/v) (0.5-2.5M) de NaCl. Les microorganismes halotolérants, même s'ils n'exigent pas le NaCl pour leur croissance, se développent en présence de fortes concentrations en sel et dans des milieux hypersalins (**Rodriguez-Valera et al., 1981**). Les bactéries nécessitant moins de 1% de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérées comme halophiles (**Ollivier et al., 1994**).

Tableau 1. Catégories de micro-organismes halophiles. (Kushner, 1985 in Hedi et al., 2009).

Catégorie	NaCl(M)		NaCl (g l ⁻¹)	
	Gamme	Optimum	Gamme	Optimum
Non halophile	0-1.0	<0.2	0-60	<10
Faiblement halophile	0.2-2.0	0.2-0.5	10-115	10-30
Halophile modéré	0.4-3.5	0.5-2.0	25-200	30-115
Halophile extrême « borderline »	1.4-4.0	2.0-3.0	80-230	115-175
Halophile extrême	2.0-5.2	>3.0	115-300	>175
Halotolérant	0->1.0	<0.2	0->60	<10

Concernant les halophiles, nombreuses définitions ont été données par différents auteurs, en fonction de leur exigence en sel (NaCl) pour une croissance optimale.

Ces gammes de concentrations en sel (NaCl) ont été redéfinies par **Lefebvre (2005)**, et s'étendent de 3 à 10% pour les procaryotes halotolérants, de 9 à 25% pour les procaryotes modérées et de 22 à plus de 40% pour les halophiles extrêmes.

Il est difficile d'établir des limites qui définissent l'halophilisme et l'halotolérance car de nombreux facteurs comme la température, la concentration et la présence de nutriments disponibles ainsi que leur nature et aussi la présence des autres sels, modifient considérablement la réponse des microorganismes au NaCl (**Kushner, 1993 ; Ventosa et al.,**

1998). Comme exemple, pour l'espèce *Halomonas halophila*, la concentration saline optimale est de 5% (p/v) à 22°C alors qu'elle est de 7,5% (p/v) lorsque la température varie de 32 à 42°C (**Quesada et al., 1987**).

D'autres définitions admettent que :

- Les microorganismes halophiles modérés sont ceux qui se développent d'une manière optimale à des concentrations de 3-15% de NaCl (0,5-2,5M) (**Echigo, et al., 2007**). Parmi ces espèces halophiles modérées appartenant au genre *Bacillus* : *Bacillus aurantiacus* (**Borsodi et al., 200**), *Bacillus chagannorensis* (**Carrasco et al., 2007**), *Bacillus coahuilensis* (**Cerritos et al., 2008**), *Bacillus isabeliae* (**Albuquerque et al., 2008**), *Bacillus oshimensis* (**Yumoto et al., 2005**), *Bacillus polygoni* (**Aino et al., 2008**), *Bacillus qingdaonensis* (**Wang et al., 2007**), *Bacillus taeanensis* (**Lim et al., 2006a**) et *Bacillus salarius* (**Lim et al., 2006b**).
- Les microorganismes halophiles extrêmes requièrent des concentrations élevées en NaCl, avec un optimum de croissance entre 15 et 30% (2,5-5,2 M) (**Echigo et al., 2005**). Comme exemple l'espèce *Bacillus haloalkaliphilus*, isolée du Lac Gabara en Égypte qui se développe à des concentrations supérieures à 4M de NaCl avec un optimum de croissance à 3M (**Weisser et Trüper, 1985**).

Le tableau 2, récapitule les différents groupes de microorganismes extrêmophiles et les paramètres environnementaux correspondants.

Dans certains marais salants, la concentration en sel (NaCl) peut atteindre 700g^l⁻¹. Dans ces conditions, les sels de lithium précipitent après des cycles de deux ans et ces milieux semblent abiotiques au vu des connaissances actuelles (**Pedros-Alio, 2004**).

Tableau 2 : Conditions extrêmes et microorganismes appropriés (Nas *et al.*, 2013).

Paramètres environnementaux et types de microorganismes	Description des microorganismes	Références
La salinité		
✓ Halotolérants	Croissance sans sel avec tolérance à des concentrations élevées	(Echigo <i>et al.</i> , 2005)
Légèrement halotolérant	• Tolérance de 6 à 8% (p/v) de NaCl	(Echigo <i>et al.</i> , 2005)
Halotolérants modérés	• Tolérance de 18 à 20 % (p/v)	(Echigo <i>et al.</i> , 2005)
Halotolérants extrêmes	• Tolérance de 0% jusqu'à saturation	(Echigo <i>et al.</i> , 2005)
✓ Halophiles	Nécessitent le sel pour la croissance	(Tiquia <i>et al.</i> , 2007)
Légerement halophiles	• 2 à 5 % NaCl (0.2-0.85M)	(Olivier <i>et al.</i> , 1994)
Halophiles modérés	• 5-20% NaCl (0.85-3.4M)	(Olivier <i>et al.</i> , 1994)
	• 3-15% NaCl (0.5-2.5M)	(Echigo <i>et al.</i> , 2007)
Halophiles extrêmes	• 20-30% NaCl (3.4-5.1M)	(Olivier <i>et al.</i> , 1994)
	• 15-30% NaCl (2.5-5.1M)	(Echigo <i>et al.</i> , 2005)
	• $\geq 10\%$ NaCl (1.7M)	(Bowers <i>et al.</i> , 2009)
✓ Les non halophiles	Nécessitant moins de 2% de NaCl	(Olivier <i>et al.</i> , 1994)
La température		
Thermophiles	• Optimum aux alentours de 60°C	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2005)
Hyperthermophiles	• Optimum entre 80-110°C	(Madigan <i>et Martino</i> , 2006)
Psychrophiles	• Optimum $\leq 15^\circ\text{C}$ pas de croissance $\geq 20^\circ\text{C}$	(Irwin <i>et Baird</i> , 2004)
Psychrotrophes	Croissance à $\leq 15^\circ\text{C}$ optimum à $\geq 18^\circ\text{C}$	(Irwin <i>et Baird</i> , 2004)
Le pH		
Les acidophiles	• Optimum à pH égale à 2	(Morokina <i>et al.</i> , 2010)
Les alcalophiles	• Croissance à pH 9, optimum entre 10-12	(Horikoshi, 1999)
La pression		
Piézophiles	• Supportent des pressions $\geq 40\text{MPa}$	(Yayanos, 1995)

3. Les microorganismes poly extrêmophiles

Certains écosystèmes qui combinent plusieurs conditions extrêmes, abritent des microorganismes qui ne sont pas seulement soumis à un facteur extrême, mais à plusieurs. Ils sont donc appelés poly extrêmophiles, telle que l'espèce archéenne *Sulfolobus acidocaldarius* qui se développe à 80°C et à un pH égal à 3 (Satyanarayana *et al.*, 2005 ; Mesbah *et Wiegel*, 2008).

Les communautés microbiennes des mers glacières de l'arctique et l'antarctique sont exposées à différentes concentrations de sel plus élevées que celles des eaux de mer. Ces microorganismes sont des halo-psychrophiles (**Vincent et al., 2004**).

Bacillus infernus "le bacille de l'enfer", est isolé à partir des profondeurs d'environ 2700m en dessous de la surface de la terre. Ce microorganisme extrêmophile est baptisé thermophile (60°C), halotolérant (concentrations de sel 0,6 M) et légèrement alcalophiles (pH 7,8) (**Boone et al., 1995**).

Natranaerobius thermophilus est une bactérie halophile alcalo-thermophile, elle a été isolée à partir d'un sédiment du lac alcalin et hypersalin de Wadi El Natrun en Egypt. Cette bactérie se développe entre 35°C et 56°C avec un optimum à 53°C. La gamme de pH permettant la croissance de cette espèce est entre 8,3 et 10,6 avec un optimum à pH 9,5 et une température 55°C. A l'optimum de la température et du pH le *N. thermophilus* se développe à une série de concentration saline comprise entre 3,1-4,9 M avec un optimum entre 3,3 et 3,9 M (**Mesbah et al., 2007**).

4. Origine des environnements hyper salins

Le sol et l'eau sont deux types d'environnements biologiquement importants où le facteur sel agit sur les populations microbiennes.

Les sols contenant des quantités supérieures à 2g/l de sels contenu dans la solution des sols sont considérés comme salins (**Kaurichev, 1983**). Ils sont très communs à travers le monde surtout dans les régions arides ou désertiques (Figure 4). Malgré cette salinité, on observe la présence de nombreuses plantes halophytes adaptées à ces environnements. Ces sols salins se caractérisent par un profil simple constitué de matières organiques et minérales encroûtées de dépôts de sel précipité comme c'est le cas des *Sebkhas*, qui sont des dépressions salines spécifiques des zones chaudes et arides (**Grant, 1989 ; Larsen, 1986**).

Les eaux sont considérées salées lorsque la salinité dépasse 0.3% (p/v) et sont définies comme hyper salées quand elles présentent des concentrations en sels minéraux supérieures à celles de l'eau de mer (3.5%) (p/v) (**Edgerton et Brimblecome, 1981**).

En ce qui concerne les 'Eaux salées' l'origine des sels est, le plus souvent, l'eau de mer. La quantité de sels dissous dans les mers ou océans a été estimée à $4.26 \cdot 10^{16}$ tonnes (**Ronov, 1968, Gavrieli et al., 1999**). On y trouve principalement 12 ions différents : Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , Sr^{2+} , HCO_3^- , Br^- , F^- , et BO_3^- (**Pipkin et al. 1977**).



Figure 4: Chott Melghir, El Oued-Algérie (Amarouche, 2008).

Même si certains auteurs estiment que la composition de l'eau de mer a pu varier au cours de l'histoire de la terre et que les océans contenaient au départ des quantités équivalentes de Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} et K^+ , il est admis que depuis 200 millions d'années, la salinité des océans n'a pas changé et représente environ 35g/l. Les ions les plus représentés sont le chlore et le sulfate avec respectivement 55,04% et 7,68%, le sodium et le magnésium avec respectivement 30,61% et 3,69% (**Oren, 1993**).

L'origine des sels, leur type et leur proportion doivent être pris en considération pour classer les milieux hypersalés en deux catégories :

Thalassohalins : Ce sont des milieux hypersalés qui ont pour origine les eaux de mer (du grec *thalasso*, la mer). Ces environnements aquatiques ont une composition en NaCl prédominante. La quantité des différents sels inorganiques est approximativement égale à celle de l'eau de la mer (**Ventoza et al., 2008**). Les marais salants, créés par de nombreux pays comme la France et l'Espagne etc., afin de produire du sel, le Grand Lac Utah (USA), les lacs hypersalés de l'arctique..., illustrent ces milieux (**Gretchen, 2006**).

Athalassohalins : L'eau de mer complètement évaporée est à l'origine des formations de dépôts de sels qui constituent à travers le temps des évaporites, considérés comme des

environnements fossiles hypersalés (Figure 5). Présents sur tous les continents, leur dissolution par l'eau crée de nouveaux milieux comme la Mer Morte, le Lac Rosé au Sénégal et certaines *sebkhas* (**Rodriguez-valera, 1993**).

Les proportions des différents sels de ces eaux sont nettement différentes de celle de l'eau de mer (Tableau 3). Leur composition ionique est influencée par celle des roches où l'ion magnésium prédomine (**Gretchen, 2006 ; Ventoza et al., 2008**).

5. Physico-chimie des environnements hypersalins

La majorité des eaux hypersalines contient 8 à 10 fois plus de sels dissous totaux que l'eau de mer (**Caumette, 1988**). Dans la plupart de ces écosystèmes, le principal sel présent, en quantité quasi inépuisable dans les mers, les océans, lacs salés et aussi dans les mines de sel, est le chlorure de sodium (NaCl) .

Dans les environnements thalassohalins, l'eau de mer est concentrée par évaporation. Tous les sels présents augmentent leurs concentrations dans les mêmes proportions jusqu'au seuil de précipitation. Les carbonates précipitent sous forme de carbonates de Ca^{2+} dès que la salinité atteint 6%. Le sulfate précipite et forme des dépôts de gypse (sulfate de Ca^{2+}) dès que la salinité dépasse 10%. Au-delà de 25 %, le NaCl commence à précipiter sous forme d'halite et précipite pleinement à 34% (10 fois la concentration de l'eau de mer). La précipitation du Mg^{2+} et K^+ n'intervient que lorsque l'eau a été concentrée environ 20 fois plus que la concentration de l'eau de mer (**Blatt et al., 1980 ; Rodriguez-Valera et al., 1985**).

Dans les environnements athalassohalins, en plus de l'ion Na^+ , d'autres ions prédominent, comme l'ion Mg^{2+} dans la Mer Morte (**Larsen, 1980**).

Les lacs hypersalés alcalins présentent une autre variation dans la composition ionique. Il y'a prédominance d'anions (carbonates et chlorures) et de cations (Na^+). Le pH des lacs hypersalins est généralement neutre ou légèrement alcalin, alors que celui de la Mer Morte est légèrement acide (**Litchfield, 1998**).

Il existe également des lacs salés alcalins tels que le lac Magadi au Kenya, le Lac Wadi Natrun en Egypte, le Lac Mono et le Lac Owens aux Etats Unis, ayant une composition ionique différente caractérisée par une absence de cations bivalents (Mg^{2+} et Ca^{2+}) (**Kharroub et al.,2007**).



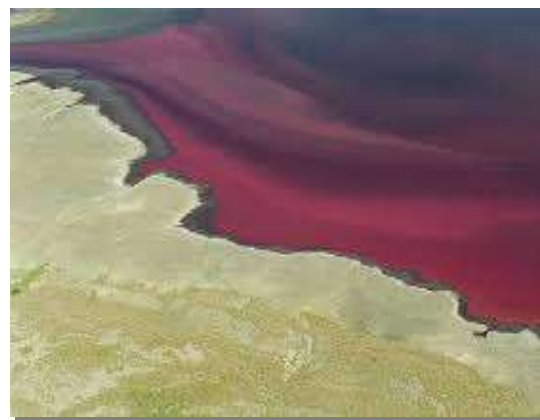
(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 5: Habitats thalassohalins : Marais salants de Costa Blanca en Espagne (a), le Grand Lac Salé Utah aux USA (b), Lac de saumure au fond de la Méditerranée -Est (©Ifremer) (c). Habitats athalassohalins : Lac Magadi au Kenya (d), Lac Rosé au Sénégal (e-f) (<http://www.jmg.centerblog.net/rub>).

Tableau 3: Composition chimique de milieux hypesralés thalassoalins et athalassoalins (Boutaiba *et al.*, 2011).

Ions	Environnements					
	Mer morte ^a	Mer ^a	Grand lac salé (USA)	Lac Natrun (Egypt)	Lac Magadi (Kenya)	Lac salé El Goléa (Algérie)
Na ⁺	40,10	10,60	105	142	46	107
K ⁺	7,70	0,38	6.70	2.30	0.06	nd
Mg ²⁺	44	1,27	11	<1	<1	0,30
Ca ²⁺	17.20	0.40	0.30	<1	<1	0.40
Cl ⁻	225	18,90	181	155	14	198
Br ⁻	5,30	0,065	0,20	nd	nd	nd
SO ₄ ²⁻	0,50	2,65	27	22,60	nd	nd
HCO ₃ ⁻ ou CO ₃ ²⁻	0.20	0.14	0.70	67.00	34.90	nd
pH	6.10	8.10	7.70	>11.50	>11.50	9.00

a, Gerday et Glansdorff, (2007) ; **b** Madigan et Martinko, (2006) ; **c** Boutaiba *et al.*, (2011). Les concentrations des ions sont en g/l ; nd, non déterminé.

- Le pH

Plusieurs lacs (Lac Big Soda, Lac Mono, Lac Soap) du grand bassin de l'ouest des Etats unis, dont la salinité varie de 89 à 100g/l, sont alcalins (pH entre 9 et 10) ; le Grand Lac Salé UTAH ou la Mer Morte qui contiennent des concentrations en sels totaux de plus de 330g/l ont des pH proches de la neutralité. **Grant et Ross**, proposèrent en 1986 une hypothèse qui permet d'expliquer les valeurs de pH observés dans ces milieux : la précipitation du calcium sous forme de carbonate de calcium (CaCO₃) et celle du magnésium sous la forme de sépiolite (MgSi₃O₈.nH₂O) influencent le pH final du milieu car la formation de la sépiolite génère des ions H⁺ et la précipitation du carbonate supprime l'alcalinité du milieu (**DasSarma et Arora, 2002**).

- La Température

Les lacs salés sont le plus souvent trouvés dans les régions arides tropicales, mais il en existe dans les régions tempérées et même polaires. La température des lacs continentaux peut énormément varier durant l'année, ainsi la température de la région du Grand Lac Salé varie de -30°C en hiver à +48°C en été (**Post, 1981**). La plupart des bactéries hétérotrophes aérobies isolées de ce lac possèdent un optimum de croissance entre 37 et 50°C.

La grande majorité de la flore halophile est mésophile ou thermotolérante. Leur température de croissance est comprise entre 45 et 50°C (**Imhoff et Triiper, 1977, Lippert et al., 1993**). A l'inverse, certaines bactéries halophiles isolées des lacs hypersalés de l'antarctique sont psychrophiles, mais celles-ci restent une exception (**Mac Meekin et Franzmann, 1988, Parry et al., 2002**).

La thermotolérance de certains organismes du domaine des *Eubacteria* peut s'expliquer par la présence de solutés, comme la bêtaïne qui protège les enzymes de la chaleur (**Bonaterra et al., 2005**). Bien que mésophiles, des algues halophiles du genre *Dunaleilla* résistent à des températures élevées ; cette résistance est attribuée à la présence de glycérol intracellulaire qui permet une stabilisation enzymatique (**Borowitzka, 1981, Irena et al., 1999**).

- L'oxygène

Les systèmes hypersalés sont des environnements anoxiques en dehors de la surface des eaux, car les températures élevées et les fortes salinités limitent la solubilisation de l'oxygène et engendrent des zones favorables à la prolifération d'une flore anaérobie. Des études effectuées en 1980 dans la Mer Morte, révèlent la présence de 0,7 à 0,9 ml d'oxygène par litre d'eau (**Por, 1980 ; Levy, 1980**). L'agitation des eaux de surfaces par le vent permet l'aération et donc la disponibilité de l'oxygène pour les microorganismes aérobies algues ou cyanobactéries des couches superficielles (**Litchfield et al., 1998**).

6. Mécanismes d'adaptation des bactéries halophiles

6.1. L'osmorégulation

Le terme "osmoadaptation" décrit l'ensemble des manifestations physiologiques et génétiques de l'adaptation à un environnement de forte ou de faible osmolarité (**Galinski, 1995**).

L'osmorégulation est le processus majeur d'osmoadaptation contrôlant l'afflux et l'efflux de solutés de la cellule dans des conditions de culture osmotiquement stressantes (**Csonka, 1989**).

La composition ionique des milieux hypersalés change en fonction de l'évaporation ou d'apport d'eaux (précipitations). Ces brusques variations ioniques conduisent les microorganismes à s'adapter rapidement à ces nouvelles conditions (**Koch, 1982**). La vie dans ces milieux n'est ainsi possible qu'au prix d'une forte spécialisation. En réponse à des teneurs élevées en sel du milieu externe, la cellule bactérienne maintient une osmolarité interne supérieure à celle de l'environnement extracellulaire (**Pocard et al., 1994**). Elle accumule dans le cytoplasme des molécules osmotiquement actives afin de restaurer une pression de turgescence cellulaire (**Kempf et Bremer, 1998**).

La stratégie d'osmoadaptation chez les bactéries halotolérantes et modérément halophiles consiste en premier lieu en l'accumulation d'ions K⁺ et de glutamate (réponse primaire) (**Sleator et Hill, 2001 ; Le Rudulier et al., 2002**) puis des solutés organiques, non chargés, de faible poids moléculaire si le choc persiste ou augmente (réponse secondaire) (**Lucht et Bremer, 1994 ; Bartlett et Roberts, 2004**).

En absence de solutés adéquates, l'eau s'échappe de la cellule afin d'équilibrer l'activité de l'eau aux deux côtés de la membrane, ce qui conduit à la réduction du volume de la cellule, altérant les concentrations intracellulaires des métabolites et l'activité des enzymes (**Shindler et al., 1997 ; Litchfield, 1998 ; Roberts, 2006**).

« *Salt in cytoplasm* » est un mécanisme spécifique aux Halobactéries (**Martin et al., 1995 ; Galinski, 1995**), grâce auquel l'équilibre osmotique est obtenu en maintenant dans le cytoplasme une concentration en sel identique à celle du milieu extérieur (**Lanyi, 1974**).

Cependant, l'accumulation de fortes concentrations en ions dans le cytoplasme est susceptible de perturber la physiologie cellulaire en provoquant l'agrégation des macromolécules et en réduisant la disponibilité de l'eau (**Lucas et al., 2003**). Aussi, les halobactéries ont développé des mécanismes d'adaptation (Figure 6) qui leur permettent de disposer d'une machinerie cellulaire capable de supporter de fortes concentrations intracellulaires en ions (**Sleator et Hill, 2002**).

6.2. Mécanisme type KCl ou Halobacterial

Stratégie adoptée par des groupes phylogénétiquement différents. Ce mécanisme implique le maintien d'une grande concentration ionique intracellulaire, où K^+ est en concentration interne supérieure à la concentration en Na^+ externe, c'est ce qu'on appelle mécanisme type KCl ou *Halobacterial* de prévention de choc osmotique, par transport d'ions à travers la membrane par des pompes ioniques. L'exclusion du Na^+ du cytoplasme se fait grâce à un antiport Na^+/H^+ , localisé au niveau de la membrane cytoplasmique (Oren, 2001). Ainsi, la concentration en sels intracellulaires (KCl) est considérée comme un agent osmorégulateur (Kushner, 1985). L'ensemble des mécanismes intracellulaires vont fonctionner en présence d'un taux élevé de salinité (Dennis et Schimmin, 1997).

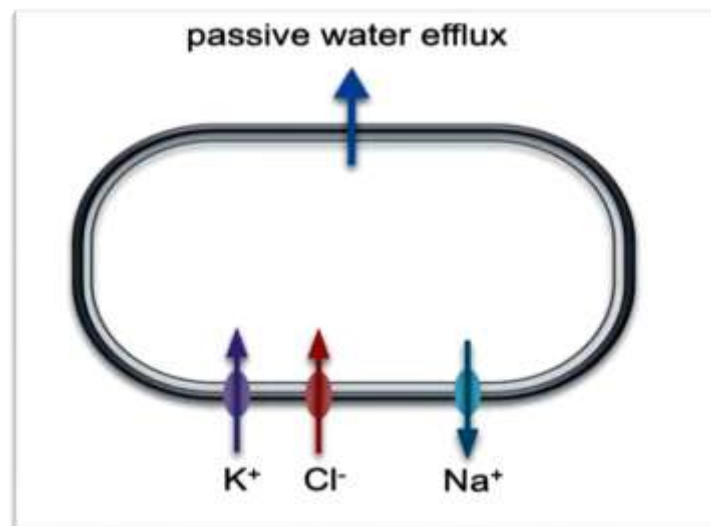


Figure 6: Stratégie « Salt-in » (Bergmann, 2015)

L'accumulation d'ions a été mise en évidence chez les Eucarya, Bacteria et Archaea. L'ion K^+ plus retrouvé que le Na^+ dont la concentration cellulaire est maintenue faible, le rapport K^+/Na^+ est très souvent supérieure à 1 (7.5 pour *Dunallilla salina*, 11 pour *Staphylococcus aureus*) (Castle *et al.*, 1986 ; Flowers *et al.*, 1977). Les micro-organismes halophiles stricts, accumulent dans leur cytoplasme du potassium ou du sodium (jusqu'à 100 fois plus de K^+) que celle de l'extérieur, alors que le chlore reste dans le compartiment extracellulaire (Kunte *et al.*, 2005). Une concentration en ion K^+ de 5,0 M a été mesurée chez *Halobacterium* lorsque la croissance a lieu à 4,0 M en ion Na^+ (Christian & Waltho, 1962 ; Grant *et al.*, 2001). Cependant, il est trouvé que chez les membres alcalophiles, il y'a accumulation également du 2-sulfotrèhalose (Desmarais *et al.*, 1997).

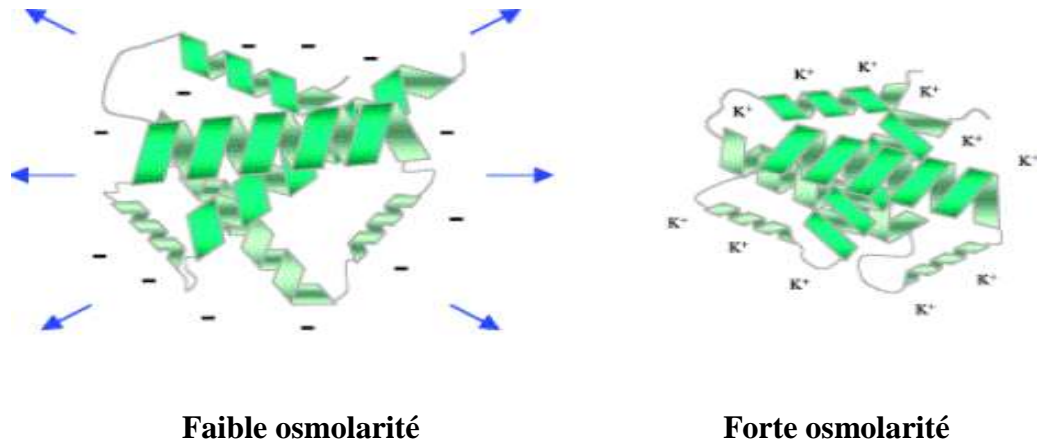


Figure 7: Effet de l'osmolarité sur la structure d'une protéine d'une Halobactérie (Sleator et Hill, in Zadi Karam *et al.*, 2012).

La deuxième stratégie d'haloadaptation est basée sur la biosynthèse et/ou l'accumulation de solutés organiques compatibles. Deux opérations au coût énergétique élevé pour la bactérie qui optera généralement pour le transport au lieu de la synthèse de ces composés organiques dissous les «osmolytes » s'ils sont déjà présents dans le milieu. Les cellules qui utilisent cette stratégie excluent le plus de sels possible de leur cytoplasme. Les solutés compatibles sont des molécules organiques très hydrosolubles qui n'interagissent pas avec les protéines et n'interfèrent pas, même à forte concentration (>1M), avec les fonctions cellulaires vitales (Sleator et Hill, 2002). Peu d'adaptation des protéines cellulaires sont donc nécessaires pour cette stratégie (Oren, 2008).

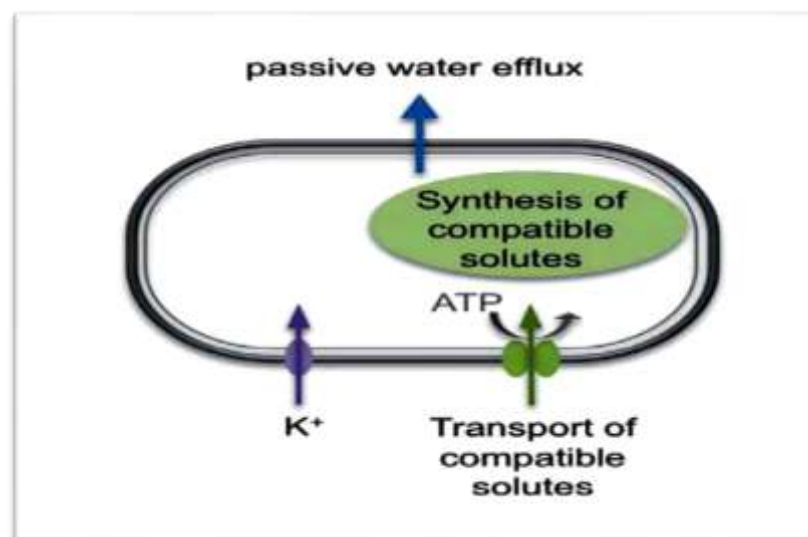


Figure 8: Stratégie « Salt-out » (Bergmann, 2015)

Ces composés agiraient comme des chaperons chimiques en aidant les protéines cytoplasmiques à conserver leur état de compaction (Figure 9) (Streit, 2008 ; Bourot *et al.*, 2000).

L'accumulation de solutés compatibles en réponse à un choc hyper-osmotique stabilise la structure des protéines en améliorant l'état d'hydratation et de compaction, participe au maintien de la pression de turgescence en augmentant le volume cellulaire (Canovas *et al.*, 2000). Il est important de noter que la stabilisation de la structure des protéines grâce à l'action des solutés compatibles a pour effet d'augmenter la tolérance vis-à-vis du sel mais aussi vis-à-vis d'autres facteurs de stress comme la chaleur, la congélation et la dessiccation (Lipper et Galinski, 1992 ; Welsh, 2000).

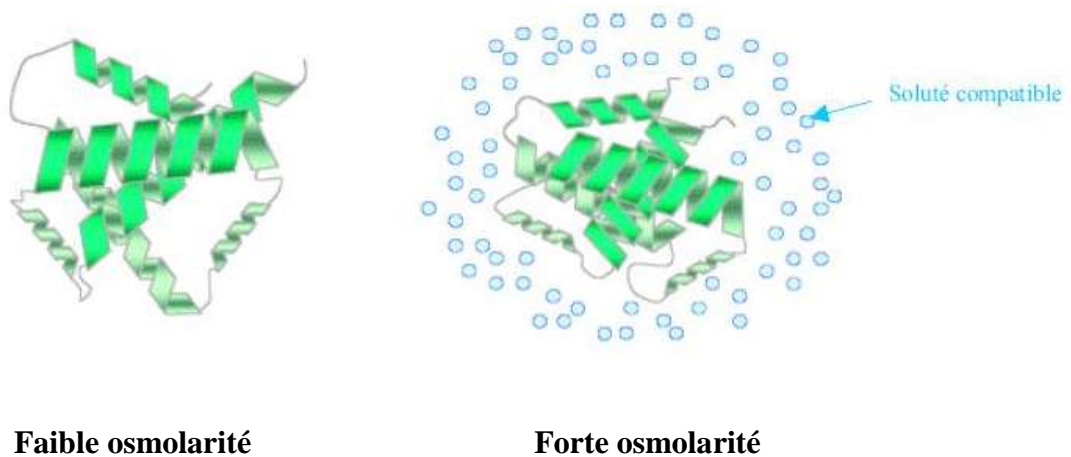


Figure 9 : Représentation de la stabilisation de la structure d'une protéine d'une Halobactérie à forte osmolarité (Sleator et Hill, in Zadi Karam *et al.*, 2012).

Selon Bremer et Krämer (2000), la gamme de solutés compatibles (ou osmoprotectants) identifiés est composée: (i) d'acides aminés (glutamate) et de dérivés d'acides aminés (ectoïne), (ii) de petits peptides (N-acetylglutamine amide), (iii) d'ammonium quaternaires appelés bétaines (GB) et de dérivés d'ammonium quaternaires (proline bétaine), (iv) de sucres (tréhalose). Le tableau 4 résume la diversité des solutés compatibles accumulés par des microorganismes halophiles. La nature des solutés compatibles accumulées par une bactérie dépend du niveau de présence de ces composés (ou de leur précurseurs) dans le milieu extérieur, de l'existence de systèmes de transport (ou de synthèse) d'osmoprotectants adéquats et de l'intensité du stress osmotique auquel elle doit faire face (Galinski, 1995 ; Beumer *et al.*, 1994).

Tableau 4 : Solutés compatibles accumulées par les microorganismes halophiles (Boutaiba *et al.*, 2005).

Microorganismes	Solutés accumulées	Références
Micro algues	Sucrose Glycerol Proline Manitole Glycine-bétaïne Dimethylsulfonio propionate	Grenway et Stetter, 1979 Brown, 1976 Ahmad et Hellebust, 1984 Blunden <i>et al.</i>, 1992
Champignons	Glycérol Arabitol Sorbitol Tréhalose	Meikle <i>et al.</i>, 1988 Larsson <i>et al.</i>, 1990
Cyanobactéries	Sucrose\ tréhalose Glycosylglycerol Glycine bétaïne	Reed <i>et al.</i>, 1984
Bactéries phototrophes	Sucrose- tréhalose Glycine bétaïne Hydroxycetoine	Welsh <i>et al.</i>, 1993
Bactéries sulfacto-réductrices	Tréhalose Glycine bétaïne	Welsh <i>et al.</i>, 1996
Bactéries hétérotrophes	Glutamate Proline N-acetylgluminyInglutamine amide Glycine bétaïne Actoine \ Hydroxycetoine Tréhalose	Welsh <i>et al.</i>, 2000
Actinomycètes	Actoine\ Hydroxycetoine Tréhalose Proline, Glutamine, alanine	Killham et Firestone, 1984
Archaeobactéries	Glycine bétaïne B-glutamate	Robertson <i>et al.</i>, 1990

Les études menées sur les Bacteria et en particulier les cyanobactéries ont montré que l'on pouvait classer ces organismes en trois groupes selon leur halotolérance. Les moins halotolérants accumulent principalement des disaccharides et du tréhalose, alors que les plus halotolérants accumulent des bétaïnes (glycine ou glutamate bétaïne) comme soluté majeur intracellulaire. Chez les cyanobactéries à tolérance intermédiaire, on retrouve le glucosylglycérol (Reed *et al.*, 1986).

Chez d'autres bactéries, ce sont les acides aminés ou dérivés et les sucres qui prédominent. L'osmoprotecteur le plus fréquemment observé est la glycine-bétaïne (Courtenay *et al.*, 2000), utilisé par de nombreux genres : *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Lactobacillus* etc. (Rudulier te Bernard, 1986 ; Hutchins *et al.*, 1987 ; Csonka, 1989 ; Smith *et al.*, 1990). Il est également réparti parmi les microorganismes halophiles et halotolérants tels que *Haloanaerobacter salinaris* (Mouné *et al.*, 1999), chez les bactéries pourpres (Imhoff, 1988) et les bactéries fermentaires (DasSarma, 2001). Le *Desulfo vibrio halophilus* accumule la glycine-bétaïne et le tréhalose (Welsh, 1996 ; Caumette *et al.*, 1997). Les cyanobactéries des sédiments hypersalins comme *Aphanothece halophytica*, l'utilise ainsi que le glucosylglycérol comme solutés compatibles, pour tolérer des salinités jusqu'à 5 M/L (Das Samara, 2001).

La plupart de ces bactéries accumulent la glycine bétaïne par absorption active, en revanche, chez les microorganismes eucaryotes halophiles du genre *Dunaliella*, il y a élaboration du glycérol à partir de ses réserves en amidon (DasSarma, 2001). Les voies de biosynthèse des solutés organiques, à l'exception de celle de la glycine bétaïne, dérivent de la synthèse du glutamate et de l'aspartate (Caumette, 1998).

Des exemples proposés par Roberts (2005), d'halophiles et d'halotolérants pour chaque soluté organique compatible, sont représentés dans le tableau (Annexe 1).

Le mode d'action des osmoprotecteurs est loin d'être clair. Ils pourraient n'être simplement que des solutés compatibles inoffensifs, ou au contraire, pourraient jouer un rôle protecteur actif interagissant avec les protéines et les protégeant de cette façon de l'action destructrice due à l'osmolarité (Galinski, 1993 ; Papageorgion & Murata, 1995 ; Welsh, 2000). Leur osmoadaptation est également moins coûteuse du point de vue énergétique (Oren, 1999).

Adaptation des protéines à l'hypersalinité

En accumulant dans leur cytoplasme des quantités de sel proches de la saturation, les organismes halophiles empêchent effectivement la sortie de l'eau mais se soumettent à un nouveau type de stress cellulaire : le stress salin. Dans de telles concentrations en KCl, des protéines « normales » deviennent insolubles et précipitent (Madern *et al.*, 1992).

Cependant, ces organismes ne semblent pas connaître ce stress. Leurs protéines sont non seulement solubles et fonctionnelles (stables, actives et flexibles) à de telles salinités, mais en

plus elles se dénaturent dès que la concentration en KCl diminue en dessous de 1,0 à 2,0 M. En ce sens, on peut dire que ces protéines sont elles-mêmes halophiles (**Brown-Peterson & Salin, 1994; Madern et al., 2000**).

La nature halophile des protéines soulève un grand nombre de questions. Depuis 1980, les scientifiques cherchaient à identifier les processus qui permettent aux enzymes d'organismes halophiles de fonctionner et ce en défiant toutes les lois de la biochimie conventionnelle. En effet, une protéine est naturellement constituée d'une chaîne d'acides aminés qui doit se replier de façon précise dans l'espace pour assurer la stabilité de l'ensemble. Ce repliement permet à la protéine d'assurer sa fonction dans la cellule. Or pour qu'une protéine puisse se replier de façon précise dans l'espace pour assurer la stabilité de l'ensemble elle doit être hydratée à sa surface. Ainsi, si une protéine « normale » non halophile est plongée dans un solvant très salé, la couche d'hydratation nécessaire au repliement ne peut se former car les molécules d'eau sont toutes piégées par le sel du solvant. La protéine devient insoluble et précipite. Il a été démontré qu'au contraire, les protéines halophiles concentraient fortement le sel près de leur surface.

Ainsi, une protéine halophile associe environ 10% de sa masse en KCl et de 40% en eau. Des mesures équivalentes sur des protéines non halophiles donnent 0% en KCl et 20% à 40% d'eau. Dès lors, au lieu de se protéger du sel comme les protéines conventionnelles, elles l'associent à leur structure et l'utilise pour capter les molécules d'eau nécessaires à leur repliement, leur stabilisation et leur solubilité. Ce phénomène est rendu possible par une abondance d'acides aminés 'acides' connus pour interagir fortement avec les molécules d'eau et les cations tels que K^+ (**Danson et Hough, 1997 ; Lozach, 2002 ; Demirjian et al., 2001**).

En 1995 et 1996, les premières structures cristallographiques de protéines halophiles issues de la Mer Morte, la malate déshydrogénase de *Halorcula marismortui* et la ferrédoxine du même organisme, ont montré que ces deux protéines se distinguent de leurs homologues non-halophiles principalement par la nature chimique des acides aminés situés à leur surface. Elles sont en effet recouvertes d'acides aminés 'acides' (aspartate et glutamate) c'est-à-dire chargés négativement et moins de résidus basiques (lysine) que leur homologue non-halophile, mais aussi plus de petits résidus hydrophobes (alanine, glycine et valine) et peu de résidus aliphatiques (**Lanyi, 1974 ; Madern et al., 1995 ; Ebel et al. ; 1999, Madern et al., 2000 ; Lozach, 2001; Oren & Mana, 2002**).

D'autres cations et anions peuvent également contribuer dans la stabilisation et particulièrement les ions divalents tels que le Mg^{2+} (Lanyi, 1974, Madern *et al.*, 2000). L'accumulation de résidus acides est donc un mécanisme d'adaptation aux fortes concentrations de sels.

Les études ultérieures ont montré que ce phénomène est généralisé à l'ensemble des protéines halophiles. Ces groupements hérissent les contours des protéines et servent d'attracteurs pour maintenir à leur surface une couche de sel hydraté (Dominique et Zakai 2004 ; Sugimori *et al.*, 2000 ; Adrian et Andrew, 1998 ; Henryk, 1995).

Pour évaluer le rôle d'un acide aminé de surface, une méthode consiste à le modifier, on fabrique alors une protéine mutante. Sur la malate déshydrogénase halophile, le remplacement d'un seul résidu acide de surface suffit à déstabiliser la structure repliée de l'enzyme. Tout se passe, en effet, comme si la perte d'un seul site interrompait le réseau d'hydratation et réduisait l'affinité globale de la protéine pour le sel. Ces expériences montrent que l'adaptation des protéines aux conditions salines extrêmes ne se résume pas à une simple augmentation d'acide aminé acide en surface. La répartition des points d'ancrage de l'eau et du sel à la surface de la structure tridimensionnelle de la protéine joue également un rôle important (Zakai *et al.*, 1995).

La biochimie des organismes halophiles est si intimement dépendante du sel que l'on est tenté d'abandonner le terme « adaptation ». En effet, personne ne peut dire si les protéines halophiles sont le résultat d'une adaptation à un environnement extrême ou bien si elles représentent la survivance de condition de vie primitive « salées ».

Certains travaux suggèrent que les océans primitifs avaient une salinité élevée. Sur un plan purement thermodynamique, la présence d'une interface constituée de sel et d'eau à la surface d'une protéine est une situation avantageuse puisque c'est le solvant qui fournit une partie importante de l'énergie de stabilisation. Par ailleurs, cette propriété étend considérablement la gamme de concentration et de température dans lesquelles les protéines halophiles restent stables, alors que les protéines non-halophiles fonctionnent dans des conditions bien plus restreintes.

On peut donc supposer que les organismes halophiles ont réussi à survivre mieux que les autres dans les milieux fluctuants en salinité comme en température et qu'au contraire ce sont les organismes non halophiles qui ont dû s'adapter pour survivre dans des environnements de faible salinité (Stan *et al.*, 2003 ; Moeva *et al.*, 2002 ; Vreeland et Rosenzweig, 2002).

7. Diversité phylogénétique

Les organismes halophiles peuvent être rencontrés dans les trois domaines de la vie (Figure 10) : Archaea, Bacteria et Eucarya (Oren., 2008). Le terme «halobactéries» est le nom informel utilisé pour décrire les membres de la famille *Halobacteriaceae*, la seule famille dans l'ordre Halobacteriales (Grant et Larsen, 1989). La plupart des halobactéries ont besoin de NaCl 1,5M pour leur croissance et sont donc souvent décrites comme des archéobactéries extrêmement halophiles (Ross *et al.*, 1981).

7.1. Archaea halophiles :

Les halophiles du domaine Archaea appartiennent à trois familles : *Halobacteriaceae*, *Methanospirillaceae* et *Methanosarcinaceae*. Les deux dernières familles contiennent également des membres non-halophiles (Yachai, 2009). La branche méthanogène des Euryarchaeota contient des halophiles dont l'activité méthanogène est possible à des seuils proches de la saturation en NaCl : *Methanohalophilus*, *Methanohalobium*, *Methanospirillum* (Kamekura, 1998 ; Oren, 2002).

D'un point de vue phylogénique (Figure 10), le domaine des archaebactéries est actuellement divisé en quatre règnes (Woese et coll., 1990 ; Barns et coll., 1996 ; Huber et coll., 2002).

1. les **crenarchaea** regroupent les organismes thermophiles soufre-dépendant (Sulfolobales, Pyrodictiales, Thermoprotéales)
2. les **euryarchaea** comprennent les Thermococcales, les Methanococcales, les Méthanobactéries et les halophiles extrêmes
3. les **korarchaea** vivent dans les sédiments des sources chaudes
4. les **nanoarchaea** regroupent des organismes de petite taille, vivant en symbiose avec certaines crenarchaea des fumées noires sous-marines.

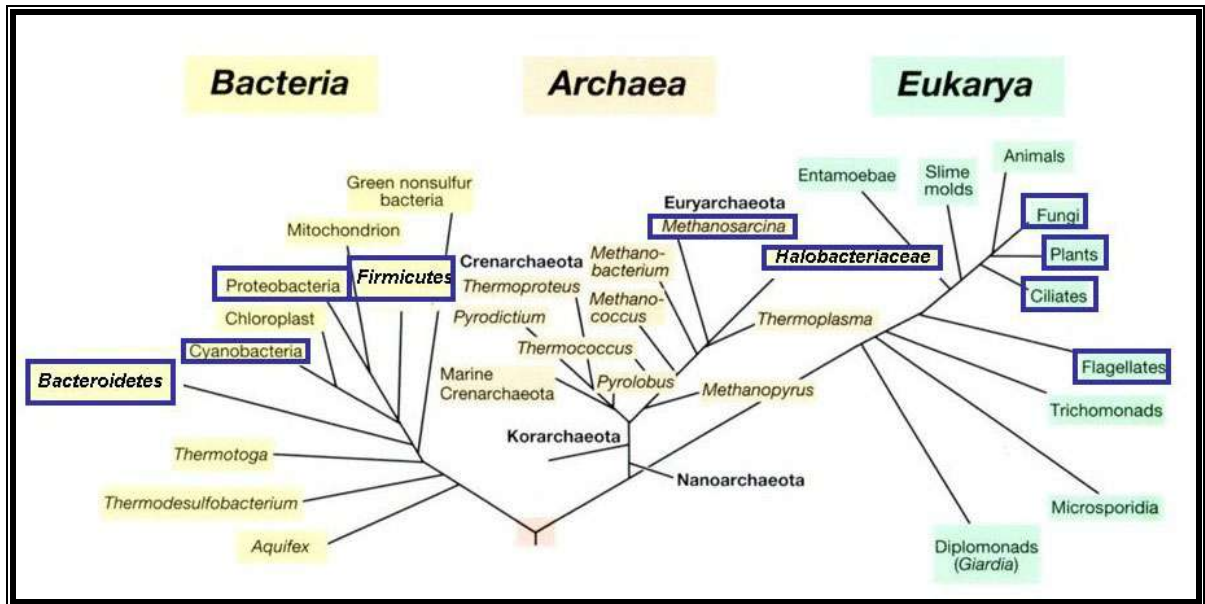


Figure 10: La distribution de microorganismes halophiles dans l'arbre du vivant (Oren, 2008).

Les groupes marqués par un cadre bleu contiennent au moins un représentant halophile. D'autres, comme les Halobactériales, sont entièrement constitués d'halophiles.

La famille des *Halobacteriaceae* (haloarchaea ou halobactéries) de l'ordre des *Halobacteriales* est composée entièrement de membres halophiles extrêmes et aérobies. Les représentants de cette famille se développent dans des environnements où la concentration saline est très élevée ($\approx 5M$) et dont leur optimum de croissance varie de 3,4 à 4,2M (20-25%, p/v). Leur paroi cellulaire, ribosomes et enzymes sont stabilisés par l'accumulation de KCl (Yachai, 2009).

La plupart des halobactéries sont colorées en rouge ou en orange ou encore en pourpre, mais certaines souches sont incolores, tandis que celles contenant des vésicules gazeuses forment des colonies opaques, blanches ou roses. Cette caractéristique physiologique intéressante est due à la présence d'un photopigment membranaire (la bactériorubérine) qui permet la production d'ATP quand la teneur en oxygène dans le milieu extérieur est trop faible. Ce composé formé d'une protéine (bactériorhodopsine) associée à un photopigment semblable à un caroténoïde (rétinal) est responsable de la couleur rouge des saumures (Oren, 2002a).

La famille des *Halobacteriaceae* comprend des halophiles aérobies, répartis au sein de 27 genres (**De la Haba et al., 2011**): *Haladaptatus*, *Halalkalicoccus*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobaculum*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Halomicrobium*, *Halopiger*, *Haloplanus*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halosarcina*, *Halosimplex*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Halovivax*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronolimnobius*, *Natronomonas* et *Natronorubrum* . Avec la description de *Halonotius* (**Burns et al., 2010**), de *Halopelagius*, *Halolamina*, *Halorussus*, *Halogramum*, *Halobellus*, *Halorientalis* (**Cui et al., 2010a; 2010b; 2010c; 2011a**), *Halomarina* (**Inoue et al., 2010**), *Halarchaeum* (**Minegishi et al., 2010**) et de *Natronoarchaeum*, *Salarchaeum* (**Shimane et al., 2010; 2011**), le nombre est passé à 38 genres .

Avec le développement des techniques de la biologie moléculaire, de nouvelles espèces bactériennes halophiles et halotolérantes ont été isolées dans divers environnements salins et hypersalins (Tableau 5), elles sont incluses dans les 5 phyla du domaine des Bacteria : *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* et *Bacteroidetes* (**Oren, 2002**).

Tableau 5 : Environnements athalassohalins et diversité microbienne (Raval et al., 2014).

Organismes	Site d'isolement	NaCl M ou % (p/v) ou g/l	pH	Remarques	Références
<i>Oceanobacillus limi</i> sp.nov.	Échantillon de boue du lac hypersalin d'Aran-Bidgol en Iran	7.5%	7	Bactérie modérément halophile	Amoozegar et al. (2014)
<i>Marinobacter persicus</i> sp.nov.	Lac hypersalin Aran-Bidgol en Iran	7,5-10%	7	Gram négatif, bactérie modérément halophile	Bagheri et al. (2013)
<i>Natronococcus roseus</i> sp.nov.	Sédiments du lac de soude Chagannor en Mongolie, Chine	30%	9,5	Bactérie halophile	Corral et al. (2013)
<i>Desulfohalophilus alkaliarsentis</i> gen.nov.sp.nov.	Environnements extrêmes du lac Scarles, Californie	55-330g/l	9,25	Bactérie halophile	Blum et al.(2012)
<i>Alkalibacillus haloalkaliphilus</i> sp.nov.	Échantillons de sol salin Sambhar Lake Rajasthan	10%	8	Aérobic, Gram positif, organisme en batonnets	Rawal et al.(2012)
<i>Desulfonatronovibrio halophilus</i> sp.nov.	Sédiments anoxiques de lacs hypersalins de chlorure et de sulfate dans le Kulunda Steppe Atlai, Russie	2M	7,5	Bactéries réductrices de sulfate modérément halophiles	Sorokin et al. (2012)
<i>Bacillus iranensis</i> sp.nov.	Lac hypersalin Aran-Bidgol en Iran	5-7,5%	7,5	Bactérie modérément halophile	Bagheri et al. (2012)
		2,5-15%	7-10		
<i>Haloarchaeobius iranensis</i> gen.nov.sp.nov.	Lac salé d'Aran-Bidgol, en Iran	3,5	7,5	Archaea extrêmement halophile, pigmenté rouge orangé	Makhdoumi-Kakhki et al. (2011)
			(6-8)		
<i>Salinivibrio sharmensis</i> sp.nov.	Lac salin du parc Ras Mohammed, Egypte	10%	9	Bactérie haloalcaliphile	Romano et al.(2011)
		(6-16%)	6-10		
<i>Marinospirillum celere</i> sp.nov.	Lac Mono, Etats-Unis	2%	9,5	Bactérie haloalcaliphile	Namsaraev et al.(2009)
<i>Bacillus persepolensis</i> sp.nov.	Lac hypersalin Howz-Soltan, Iran	10%	8,5	Bactérie modérément halophile	Amoozegar et al. (2009)

<i>Bacillus aidingensis</i> sp.nov.	Échantillons de sédiments provenant du lac salé d'Ai-Ding, Chine	12%	7,2	Bactérie à Gram positif, halophile	Xue et al. (2008)
<i>Halomonas cerina</i> sp.nov.	Sol salin, Espagne	10%	8	Bacilles à Gram négatif halophiles modérées, encapsulées et non mobiles	Ganzalez-Domenech et al. (2008)
<i>Halomonas saccharevitans</i> sp.nov. <i>Halomonas arcis</i> sp.nov. et <i>Halomonas subterranea</i> sp.nov.	Lac salé, Qinghai-Tibet dans le bassin de Si-Chuan, Chine	7,5%	8	Bactéries à Gram négatif, aérobies, neutrophiles et halophiles	Xu et al.(2007)
		5%	8		
		5%	8		
<i>Halomonas mongoliensis</i> sp.nov.z-7009 et <i>Halomonas kenyensis</i> sp.nov., AIR-2	Isolés des lacs de soda en Mongolie et au Kenya	28g/l 28g/l	9.3 (8-10,5) (7,5-10,6)	Modérément halophiles Haloalcaliphiles	Boltyanskaya et al. (2007)
85 souches différentes du genre <i>Thioalkalivibrio</i>	Lacs de soude en Mongolie (Hotontyn, Dzunundzin, Sharburdiin, Golyntsagan, Gurbany, Behiin) Kenya (Nakaru, Magadi, Bogoria, Cratère Lke, Elementcita), Californie, Lac Mono Egypte (Wadi Natrun, Gaara, Umm-risha, Hamra, Beida, Fezdah, Zugm, Ruzita, Khadra) et la Sibérie (Hady, Tantar III, Elongated Lake, Narrow Lake, Borzinskoy, Stamp Lake, Tsaidam)	Total salts	9,2-10,5	Bactéries haloalcaliphiles, chimiolithoautotrophes, oxydant le soufre	Foti et al. (2006)
		50-360g/l	9,5-11,0		
		20-220g/l	9,7		
		90g/l	9,5-10,3		
		200-380g/l	9,2-10,6		
		10-380g/l			

Haloalkaliphilic strain z-7026	Sédiments d'un lac de soude isolé sur milieu I et production de cellulase optimisée sur milieu II	2,6g/l	8-8,5	Bactérie anaérobie obligatoire sécrétant de la cellulose appartient au groupe III de Clostridia à faible teneur en G + C	Zvereva et al. (2006)
		10g/l	8,8		
Quatre souches haloalkaliphiles appartiennent au groupe <i>Alkalispirillum-Alkaliliminocola</i>	Lac de soude Kenya, lac Magadi Mongolie: un échantillon mixte de deux lacs hypersalins et un échantillon du lac salé Guryan Nur un échantillon mixte de huit lacs Wadi Natrun en Egypte	Total salts	10,5	Aérobies obligatoires, capables de croître anaérobiquement avec de l'acétate en utilisant soit le nitrate soit le N ₂ O comme accepteurs d'électrons	Sorokin et al.(2006)
		240g/l	9,5-10,3		
		200-390g/l	10,2		
		50g/l	9,2-10,2		
220-360g/l					
Haloalkaliphiles appartenant à <i>Thioalkalimicrobium</i> , <i>Thioalkalivibrio</i> et <i>Thioalkalispira</i>	Lacs de soude	0,5-1M	10	Chimolithotrophe, oxydant le soufre, réduisant les nitrates	Soirokin and Kuenen (2005)
<i>Haloalkalicoccus tibetensis</i> gen.nov.sp.nov.	Lac Zabuye, plateau tibétain, Chine	3.4M	10	Archaea haloalcalophile	Xue et al. (2005)
<i>Halobiforma lacisalsi</i> sp.nov.	Lac salé Xinjiang, Chine	(2,6-4,3M)	7,5	Souche à Gram négatif, mobile, neutrophile et extrêmement halophile	Xu et al. (2005)
<i>Halobacillus dabanensis</i> sp.nov. et <i>Halobacillus aidiensis</i> sp.nov.	Lac salé Xinjiang, Chine	10%	7.5	Bactéries modérément halophiles, à Gram positif format des spores	Liu et al. (2005)
		(0,5-25%)	(5-11)		
		10%	7,5		
(5-20%)	(6-10)				
<i>Halkalibacillus salilacus</i>	Lac Ai-Ding dans la province de Xin-Jiang en Chine.	10-12%	8 (7-9)	Bactérie strictement aérobie, halophile, sporulée, mobile et à Gram positif	Jeon et al.(2005)
		(5-20%)			
<i>Halobacillus dabensis</i> D-8T <i>Halobacillus aidiensis</i> AD6T	Lacs salés, région de Xinjing en Chine.	10%	7,5	Bactérie halophile, aérobie, hétérotrophique, formant des spores	Liu et al. (2005)
		(0,5-25%)			
		10%	7,5		
		(0,5-20%)			

<i>Marinococcus halotolerans</i> sp.nov.	Sol salin situé à Qinghai, au nord-ouest de la Chine	10%	7-7,5	Bactéries à Gram positif, modérément halophiles	Liu et al.(2005)
<i>Aeromicrobium alkaliterrae</i>	Sol alcalin -Corée	<9%	11	Bactéries alcaliphiles à Gram positif	Yoon et al. (2005b)
<i>Thialkalinivibrio thiocyanodenitrificans</i>	Sédiments d'un lac de soude	0,3-1,8	9,6-10	Bactérie oxydant le soufre	Sorokin et al. (2004)
<i>Halorubrum alkaliphilum</i> sp.nov. <i>Halorubrum xinjiangense</i> sp.nov.	Lac de soude, Xinjiang, Chine.	20%	10%	Archées haloalcaliphiles	Feng et al. (2004)
<i>Thialkalinivibrio halophiles</i> sp.nov.	Lac hypersalin alcalin dans la steppe de l'Altaï, Russie	0,2-5M	7,5-8,9	Bactérie chimiolithoautotrophe oxydant le soufre. Glycine betaine comme solutés compatibles clés	Banciu et al. (2004)
<i>Halorubrum tibetens</i> sp.nov.	Lac Zabuye au Tibet, Chine	3,4M	9,5	/	Fan et al. (2004)
<i>Halomonas compisalis</i> Z-7398-2	Lac Magadi (Kenya)	1M	8,8-9,5	Modérément halophile, alcaliphile mobile en forme de batonnêt	Boltianskaia et al. (2004)
<i>Methylophaga natronica</i> sp. nov.	Lac de soude, Tranbaikal	2-3%	8,5-9	Bactérie alcaliphile et modérément halophile	Doronina et al. (2003a)
<i>Methylophaga alcalica</i> sp.nov.	Lac de soude Mongolie	3.4%	9-9,5	Bacilles courts mobiles à gram négatif G + C, 48,3%	Doronina et al. (2003b)
<i>Spirochaeta americana</i> sp.nov	Lac Mono hypersalin alcalin Californie, Etats-Unis	2-12%	8-10,5	Gram négatif en forme de spirochète mobile, anaérobie obligatoire	Hoover et al. (2003)
<i>Halobacillus salinus</i> sp.nov.	Lac salé sur la côte de la mer de l'Est en Corée	2-10%	7	Bactérie à Gram positif, halophile	Yoon et al.(2003)
<i>Tindallia californiensis</i> sp.nov.	Lac Mono, Californie, Etats-Unis	3,5% (1-20%)	9,5 (8-10,5)	Extrêmement haloalcaliphile, strictement anaérobie, bactérie à formation de spores à Gram positif, bâtonnets mobiles légèrement incurvés. Mole G +	Pikuta et al. (2003)

				C; 44,4%	
<i>Halobacillus karajensis</i> sp.nov.	Sol salin du Karaj, Iran	1-24%	6-9,6	Puissant producteur d'amylase	Amoozegar et al. (2003)
<i>Ectothiorhodospira</i>	Lac Mono, Californie, Etats-Unis	70-90g/l	9,8	Anaérobie facultative, chimioautotrophe oxydant l'arsénite	Oremland et al. (2002)
<i>Thioalkalivibrio Thiocyanoxidans</i> sp.nov. <i>Thioalkalivibrio paradoxus</i> sp.nov.	Lacs de soude dans le sud-est de la Sibérie, au Kenya et en Egypte	4M	10	Bactéries oxydant le soufre, autotrophes, capables de croître avec le thiocyanate (SCN-) comme unique source d'énergie et d'azote	Sorokin et al. (2002a)
<i>Thioalkalimicrobium cyclicum</i> sp. nov. et <i>Thioalkalivibrio jannaschii</i> sp.nov.	Lac alcalin Mono, Californie, Etats-Unis	(3-4%)	10	Bactéries oxydant le soufre	Sorokin et al.(2002b)
<i>Salinicoccus alkaliphiles</i> sp.nov.	Lac de soude, Chine	(0-25%)	6,5-11,5	Gram-positif alcaliphile et modérément halophile	Zhang et al.(2002)
<i>Thioalkalispira microaerophila</i> gen.nov.sp.nov.	Les lacs de soude du sud-est de la Sibérie, du Kenya et de l'Egypte	(0-25%)	10	Autotrophe, oxydant le soufre, capable de croître sur le thiocyanate	Sorokin et al. (2002c)
<i>Thindallia magadiensis</i>	Dépôt de soude, souche type isolée du lac Magadi	(0,51-1)M	8,5 (7,5-10,5)	Bactéries haloalcaliphiles, strictement dépendantes du Na ⁺ pour une croissance optimale	Kevbrin et al.(1998)
<i>Halomonas meridian</i> sp.nov.	Lacs hypersalins de Vestfold Hills, Antarctique	ND	ND	Bactéries non pigmentées halotolérantes	James et al. (1990)

7.2. Eucaryotes halophiles :

Avec quelques exceptions notables, les microorganismes eucaryotes forment un groupe tristement négligé, tant par l'étude de leur distribution dans des environnements hyper-salins que leur adaptation physiologique. Les algues vertes unicellulaires du genre *Dunaliella* sont examinées de façon détaillée, étant donné qu'ils sont les principaux ou uniques « acteurs » dans beaucoup d'environnements hypersalins (**Oren, 2008**). Ils sont d'avantage halotolérantes que strictement halophiles et tolèrent une large gamme de salinité. On rencontre également dans ces environnements un crustacé du genre *Artemia* (*Artemia salina*, *Artemia franciscana*) (**Oren, 2002a**).

Les moisissures, longtemps négligées dans la recherche des halophiles, contiennent un certain nombre de représentants halophiles faibles et modérés tels que *Cladosporium*, *Aspergillus* et *Penicillium spp.* (**Gunde-Cimerman et al., 2000; 2005; Kis-Papo et al., 2003**)

Enfin, parmi les eucaryotes, des levures osmotolérantes (*Rhodotorula mucilaginosa* et *Pichia guilliermondii*) isolées de bassins d'évaporation d'effluents pharmaceutiques croissent à 15% de sel et même au-delà (**Lahav et al., 2002 ; Dan et al., 2003**). Des levures noires *Hortaea werneckii*, *Phaeotheca triangularis* et *Aureobasidium pullulans* (**Zalar et al., 1999; Gunde-Cimerman et al., 2000**). Des protozoaires flagellés ont été observés dans des étangs artificiels (**Cho, 2005**).

7.3. Bactéries halophiles :

Le domaine des Bacteria regroupe la plus grande diversité des halophiles, la plupart étant halophiles modérées plutôt qu'extrêmes. Ces microorganismes aérobies, hétérotrophes, forment un groupe phylogénétique très hétérogène. Ils sont inclus dans 5 phyla: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* et *Bacteroidetes*.

7.3.1. Phylum Proteobacteria :

Le phylum Proteobacteria a été proposé par **Garrity et al. (2005)** sur la base de l'analyse phylogénétique des séquences du gène codant l'ARNr 16S. Les microorganismes appartenant à ce phylum peuvent être isolés de divers environnements comprenant des habitats marins, hypersalins, alcalins et acides.

La famille des *Halomonadaceae* de la classe *Gammaproteobacteria* contient le nombre le plus important d'espèces halophiles modérées (**Franzmann et al., 1988**).

Ces dernières ont été isolées de plusieurs habitats différents, à savoir, les lacs hypersalins et/ou alcalins, sols salins, environnements hydrothermiques, gisements de pétrole etc. (**Kim et al., 2010**). Cette famille comprend également trois genres de bactéries halophiles extrêmes apigmentées (**Maturrano, 2006 ; Sorokin et al., 2006a**) dont une des espèces a été isolée de sebkhia Ezzemoul (Ain M'Lila) en Algérie (**Kharroub et al., 2006a**).

La famille des *Alteromonadaceae* (**Ivanova et Mikhailov., 2001**), inclut des *protéobactéries* halophiles modérées dont le genre *Marinobacter* (**Gauthier et al., 1992**).

7.3.2. Phylum Firmicutes :

Les membres du phylum *Firmicutes* sont hautement diversifiés au niveau morphologique et physiologique et sont capables d'habiter une grande variété d'environnements tels que les habitats hypersalins. La famille des *Bacillaceae* appartenant à ce phylum est la plus importante avec 21 genres incluant des espèces halophiles obligatoires (**Ludwig et al., 2008**). Le genre *Halobacillus*, a particulièrement retenu l'attention, des études physiologiques réalisées sur ce genre se sont focalisées sur l'espèce type *Halobacillus halophilus*. Plusieurs approches ont démontré l'importance du chlorure non seulement pour la croissance de cette bactérie mais également pour la motilité et la synthèse flagellaire, la germination des endospores, la régulation d'une variété de protéines et le transport de l'osmoprotecteur glycine bêtaïne (**Roeler et Müller., 1998, 2002 ; Dohrmann et Müller, 1999 ; Roeler et al., 2000**).

7.3.3. Phylum Actinobacteria :

La classe *Actinobacteria* constitue l'un des principaux groupes du domaine *Bacteria* (**Ludwig et Klenk., 2001**) répartie en 48 familles (**Zhi et al., 2009**). Elle contient des bactéries halophiles incluses dans l'ordre des *Actinomycetales* (**Stackebrandt et al., 1997; Zhi et al., 2009**).

7.3.4. Phylum Spirochètes :

Quatre espèces modérément halophiles des *Spirochètes* ont été décrites, toutes appartenant au genre *Spirochaeta*. Il s'agit de *Spirochaeta halophila* (**Greenberg et Canale-Parola, 1976**), des espèces *holoalcaliphiles* (*Spirochaeta africana* et *Spirochaeta alkalica*) et de *Spirochaeta asiatica* (**Zhilina et al., 1996**).

7.3.5. Phylum Bacteroidetes :

Ce phylum se compose de trois classes *Bacteroidia*, *Flavobacteria* et *Shingobacteria* (Garrity et Holt, 2001). Ces dernières incluent des espèces halophiles faibles et modérées (Denger et al., 2002; Donachie et al., 2004; Nedashkovskaya et al., 2005) et uniquement quatre espèces halophiles extrêmes aérobies et pigmentées: *Salinibacter ruber* (Antón et al., 2002), *Salinibacter iranicus*, *Salinibacter luteum* (Makhdoumi-Kakhki et al., 2012) et *Salisaeta longa* (Vaisman et Oren, 2009).

8. Usages biotechnologiques

8.1. Utilisation de cellules entières d'archées en biotechnologie

L'une des premières applications possibles est la biolixiviation (utilisation de microorganismes pour transformer les minéraux solides en forme soluble), utilisée essentiellement pour concentrer les métaux (cuivre, or et uranium) lorsque les concentrations initiales de minerais sont faibles et les procédés chimiques conventionnels non rentables. Cette approche, développée en Afrique du Sud, au Brésil et en Australie, fait en général appel à des cultures de bactéries mésophiles des genres *Thiobacillus*, *Acidithiobacillus* et *Leptospirillum*. Toutefois, différents travaux ont mis en évidence l'intérêt des archées *Pyrobaculum*, *Pyrococcus*, *Sulfolobus* et *Metallosphaera*. Bien qu'inadaptées à des traitements en milieu ouvert, ces espèces hyperthermophiles et thermocacidophiles satisfont aux exigences de fonctionnement à haute température en réacteurs contrôlés pour le traitement de certains minerais comme la chalcopryrite ou la pyrite (Williams YJ et al., 2009).

Un second type d'application est directement lié aux caractéristiques de certaines archées halophiles extrêmes, aptes à être utilisées en bioremédiation en cas de contamination par divers produits chimiques, métaux lourds, radionucléides ou composés halogénés. Ainsi, *Haloferax mediterranei* est capable d'utiliser le pétrole brut, *Halobacterium* sp. peut dégrader les *n*-alcanes à chaînes carbonées comportant 10 à 30 carbones à des teneurs de 30% en NaCl. Ces mêmes genres et *Haloarcula* peuvent dégrader les composés halogénés comme les trichlorophénols et le lindane.

Les halophiles sont une source importante d'enzymes ayant des activités optimales dans différentes concentrations en sel. Les enzymes de ces halophiles sont non seulement halotolérantes mais aussi pour la plupart thermo-tolérantes (Sanchez-Porro et al., 2003).

Les technologies de l'ADN recombinant reposent sur l'utilisation d'enzymes très diverses : enzymes de restriction, ADN polymérase, ADN ligases...etc. Les ADN polymérase thermostables jouent un rôle fondamental dans les techniques d'ingénierie du vivant grâce à leur aptitude à amplifier un gène donné à des millions de copies *in vitro* par PCR, amplification isotherme, etc. L'enzyme la plus utilisée en PCR est la Taq polymérase, isolée de la bactérie *Thermus aquaticus*. Les ADN polymérase des archées hyperthermophiles *Pyrococcus* et *Thermococcus* occupent le deuxième rang, avec 30% du marché (**Palud et al., 2008**).

Les protéases alcalines constituent un groupe très important parmi les enzymes des microorganismes alcalophiles (**Rao et al., 1998**). **Horikoshi** fut le premier, en 1971, à démontrer que le genre *Bacillus sp.* (Souche 221) secrète des protéases alcalines. Depuis, plusieurs protéases alcalines isolées à partir d'autres espèces ont été étudiées, caractérisées et commercialisées (**Schallmey et al., 2004**). Elles ont une grande importance grâce à leur stabilité à différentes conditions environnementales (**Kazan et al., 2005**).

Les archées constituent un gisement extrêmement varié d'enzymes intéressantes pour la dégradation de l'amidon : amylases, glucoamylases et α -glucosidases.

Les α -amylases de plusieurs espèces d'archées hyperthermophiles appartenant aux genres *Sulfolobus*, *Thermococcus*, *Pyrococcus* et *Methanocaldococcus* sont caractérisées par leur thermostabilité extrême et leur optimum de température compris entre 80 et 100°C. Certaines, comme celles de *Pyrococcus* et *Methanocaldococcus*, sont actives jusqu'à 130°C.

Dans un autre registre, les α -amylases de certaines halophiles, telles que *Haloarcula*, sont actives en solutions à concentrations élevées en NaCl ainsi que dans des solvants (benzène, toluène, chloroforme...etc.). De même, il existe des amylases issues d'alcaliphiles fonctionnelles à pH 10. Si les amylases sont bien représentées chez les archées, les glucoamylases y sont relativement rares. Faisant figure d'exception, les archées thermoacidophiles *Thermoplasma* et *Picrophilus* possèdent ces glucoamylases, dont l'optimum d'activité se situe à pH 2 et à 90°C (**Egorova, Antranikian in Garrett et Klenk, 2007**).

Autre ingrédient majeur à convertir, le xylane, constituant principal de l'hémicellulose. Jusqu'à présent, la présence de xylanases chez les archées reste relativement exceptionnelle. Isolées et caractérisées chez *Pyrodictium abyssi*, *Sulfolobus solfataricus* et *Thermosphaera aggregans*, elles sont actives à haute température (100°C) et très thermostables, ce qui leur confère un vaste potentiel d'applications (traitement de la pâte à papier...etc...) (**Nordon et al., 2009**).

Les lipases : qui catalysent l'hydrolyse des triglycérides présentent ainsi un intérêt potentiel pour l'industrie des détergents. **Boutaiba et al. (2006)** ont pu mettre en évidence l'activité lipolytique d'une archaeobactérie halophile extrême, *Natronococcus sp.* qui hydrolyse le gras, ayant un intérêt biotechnologique.

La première carboxylestérase de *Sulfolobus acidocaldarius*, en 1988, depuis, de nombreuses estérases d'archées ont été isolées, notamment chez l'archée hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. Les pH optimaux s'échelonnaient entre 6 et 9, mais celui de la lipase d'*A. fulgidus* atteint 11. La majorité des carboxypeptidases issues d'archées hyperthermophiles affichent une excellente thermostabilité et une activité optimale à des températures comprises entre 70 et 100°C.

Une proportion importante de ces estérases est stable en présence de solvants organiques. C'est le cas des EstA et EstB, isolées de *Picrophilus torridus*, qui présentent une activité optimale de 55 à 70°C et à pH 6,5-7, remarquablement bien conservées en présence de détergents, d'urée et de solvants organiques d'usage courant (**Hess et al., 2008 ; Levisson et al., 2009**).

8.2. Production de polymères Production de plastiques biodégradables pouvant remplacer le dérivé d'huile thermoplastique, dérivant du pétrole, dans plusieurs domaines (**Margesin et Schinner, 2001**), par exemple : bêta-hydroxy acide butyrique, produit et accumulé par *Haloferax mediterranei* à partir de n-butyrique, sa récupération est facilitée par la lyse cellulaire causée par de faibles concentrations en sel (**Ventosa et Nieto, 1995**)

Deux types de molécules présentent un intérêt particulier : les polyhydroxyalkanoates (PHA), intracellulaires, peuvent être utilisés comme plastiques biodégradables, tandis que les exopolysaccharides (EPS) ont de multiples applications dans l'agroalimentaire, la cosmétique et la santé.

Plusieurs espèces d'archées peuvent synthétiser des PHA, dont *Natrialba aegyptiaca* et *Haloferax mediterranei*, chez qui l'accumulation peut atteindre 60% du poids sec cellulaire et pour laquelle la récupération est effectuée par simple lyse cellulaire en milieu dessalé. *Haloferax* peut également produire des EPS dans certaines conditions (**Querellou J, 1999**).

8.3. Production de substances antibactériennes

Les halophiles produisent des substances antibactériennes appelées «halocines» qui présentent un large mode d'action (inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN, bactériolyse et déstabilisation de la membrane cellulaire) (**Oren, 1999**).

Par contre, leur spectre d'action est étroit : elles n'agissent que sur les microorganismes phylogénétiquement proches de la souche productrice.

Matériel et Méthodes

« L'extraordinaire se trouve sur le chemin des gens ordinaires. »

P. Coelho.

1. Présentation de la région d'étude

1.1 Localisation géographique :

Ouargla, l'une des principales oasis du Sahara algérien, est située au Sud-est du pays, à 800km de la capitale Alger. Elle s'étend sur une superficie d'environ 154 300 km². Elle est limitée au Nord-est par la wilaya d'El Oued, au Nord-ouest par la wilaya de Djelfa, au Sud-est par la wilaya d'Illizi et à l'Ouest par la wilaya de Ghardaïa (Figure 11). Ses coordonnées géographiques sont : les longitudes 5°15' et 5°25' Est et les latitudes 31°55' et 32°00' Nord, avec une altitude moyenne de 140m (Halassa, 2007 ; Negais, 2007).

1.2. Concepts des *Chotts* et *Sebkhas*

Ces vastes dépressions endoréiques (du grec ancien: endo : en-dedans, et rhein : couler); un terme d'hydrologie décrivant un bassin versant clos retenant les eaux (superficielles ou non), sont synonymes de *Chotts* ou *Sebkhas* en Afrique du Nord, en Amérique du Nord et au Proche-Orient. En Afrique du Sud, aux Etats-Unis et en Australie ; c'est l'équivalent de Salt pans alors qu'en Amérique du Sud *Salinas* ou *salures*, au Mexique *Playa*, en Asie leur appellation diffère d'une région à une autre, à titre d'exemple en Iran connues sous le nom de *Kévin* et en Mongolie *Nor* (Joly, 2006 ; Schultz *et al.*, 2002, in Demmati *et al.*, 2013). Au Maghreb, on emploie volontiers le terme de *Chott* pour les désigner (Incorvaia, 2004).

Dubost (2002), décrit le *Chott* comme une zone salée entourant la *sebkha*, qui est le fond humide de la dépression. Le mot *sebkha*, issu de l'arabe, désigne des dépressions fermées au Sahara, en forme de cuvette, périodiquement inondées et dans lesquelles se produit une accumulation de sel. Malgré quelques divergences dans la définition de ces milieux (*Chott*, *Sebkha*, *Garaet*), les géographes, les scientifiques, les biologistes s'accordent pour les considérer comme des dépressions fermées qui sont équivalent des lacs salés.

- Présentation du site d'Oum Eraneb

Le *chott* d'Oum Erraneb est une zone humide situé à environ 7 km au Nord-est de la ville de Ouargla. Localisé entre l'agglomération de Sidi-Khouiled (Chef lieu de la commune du même nom) au sud et l'agglomération d'Oum-Er-Raneb au Nord. Le Chott est allongé selon une direction Nord-sud, d'une profondeur qui n'excède pas un mètre et une superficie qui varie de 900 à 1400 hectares en fonction du niveau de l'eau (Negais, 2007).

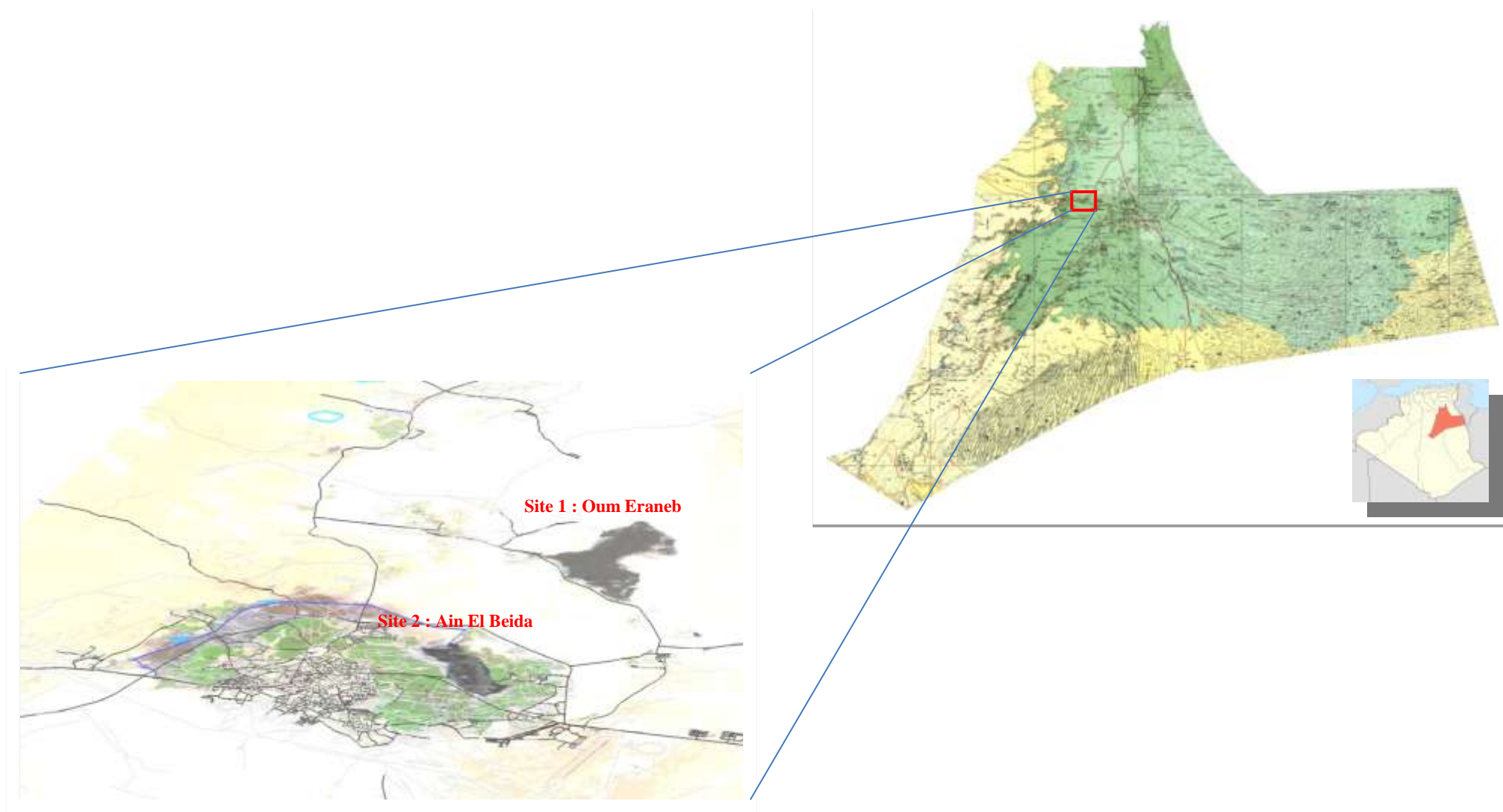


Figure 11: Situation géographique de la wilaya de Ouargla et sites d'étude (ANRH-Ouargla 2019)

Entouré par des formations dunaires au Nord, à l'Est et au Sud, ses coordonnées géographiques sont : Latitude $32^{\circ} 01' 31''$; Nord, longitude $2^{\circ} 21' 51''$; Est (I.N.C.T, 2006). Très pauvre en végétation, ce site reçoit les eaux usées en partie traitées de la ville Ouargla, ainsi que les eaux de drainage agricole.

- **Présentation du *Chott d'Aïn El beïda***

Le *chott* d'Aïn El Beïda constitue le point bas de la ville de Ouargla. Se situe à 6Km à l'Est du chef-lieu de la wilaya. Il couvre environ une superficie de 1000 hectares. Allongé en direction Nord-ouest, Sud-est sur une longueur de 5,3 km, sa largeur varie de 1 à 1,5km, ne dépassant pas 1,50m de profondeur (Ramsar, 2005). L'alimentation en eau du *chott* se fait à partir de la nappe phréatique dont le niveau varie en fonction de la saison et des actions de l'homme (drainage de la palmeraie et irrigation).

Le *Chott* d'Aïn El Beïda est divisé en quatre zones distinctes par l'implantation d'infrastructures plus ou moins récentes. Le canal de drainage des eaux de la palmeraie sépare longitudinalement le *chott* (BG, 2004). Les coordonnées géographiques sont : Longitude $5^{\circ}22'42''$ à $5^{\circ}21'52''$ Est, latitude $31^{\circ}57'30''$ à $31^{\circ}59'2''$ Nord.

2. Prélèvement des échantillons

Les échantillons sont collectés à partir de l'eau et des sédiments. L'isolement est effectué à partir des deux biotopes. L'accès aux sites est souvent entravé par le niveau de l'eau élevé (période de rejet des eaux usées) ou par un sol qui s'effrite en période chaude de l'année.

Les campagnes de prélèvement étaient organisées durant les six mois de l'année 2013, précisément du mois de janvier au mois de Juin. Les prélèvements sont effectués sur 4 points espacés le long de chaque *sebkha*. Le positionnement GPS (Global Position Satellite) des points d'échantillonnage et de l'altitude, sont donnés dans le tableau 6. L'image des sites montrant les stations de prélèvement sont illustrés dans les figures 12 et 13 (Google Earth, 2013).

Au moment du prélèvement, un flacon en verre stérile de 250ml et une bouteille de 500ml sont remplis, le premier destiné aux analyses bactériologiques, le second soumis aux analyses physico-chimiques. Les échantillons sont pris à différents niveaux à une profondeur allant de 10 à 30cm.

Les sédiments sont raclés à la surface sur 10cm pour l'analyse microbiologique et environ 250gr sont prélevés pour l'analyse physicochimique (**Fardeau et al., 2006**). Les échantillons sont acheminés le jour même au laboratoire.

Tableau 6: Localisation des points de prélèvements au niveau des deux sites

Points de prélèvement	Localisation
OR1	X= 7 25744m Y= 3546023m, Z= 131m
OR2	X= 725283m Y= 3546026m, Z= 130m
OR3	X= 724647m Y= 3546977m, Z= 129m
OR4	X= 724068m Y= 3547595m, Z= 128m
AB1	X= 724722m Y= 3538307m, Z= 130m
AB2	X= 723937m Y= 3538489m, Z= 130m
AB3	X= 723547m Y= 3539048m, Z= 128m
AB4	X= 723826 m Y= 3538275m, Z= 129m

3. Analyses physico-chimiques :

La salinité totale, la composition ionique et le pH sont importants à déterminer car ils influent sur la population microbienne dans tout environnement hypersalin (**Grant, 2004**)

➤ Le pH :

C'est une mesure de la concentration des ions hydrogène en solution. Dans les eaux naturelles, le pH dépend de l'origine de ces eaux et de la nature géologique du sous-sol. Pour les échantillons d'eaux de chaque site, cette mesure a été effectuée sur place par méthode électro métrique à l'aide d'un pH mètre de terrain de type WTW, pH 3L5i.

➤ La température :

Il est important de connaître la température de l'eau avec une bonne précision. En effet, celle-ci joue un rôle dans la solubilité des sels et surtout des gaz, dans la dissociation des sels dissous et donc sur la conductivité électrique et dans la détermination du pH (**Rodier 2005**). Elle est mesurée *in-situ* à l'aide d'un thermomètre intégré au pH mètre de terrain (Annexe 2).

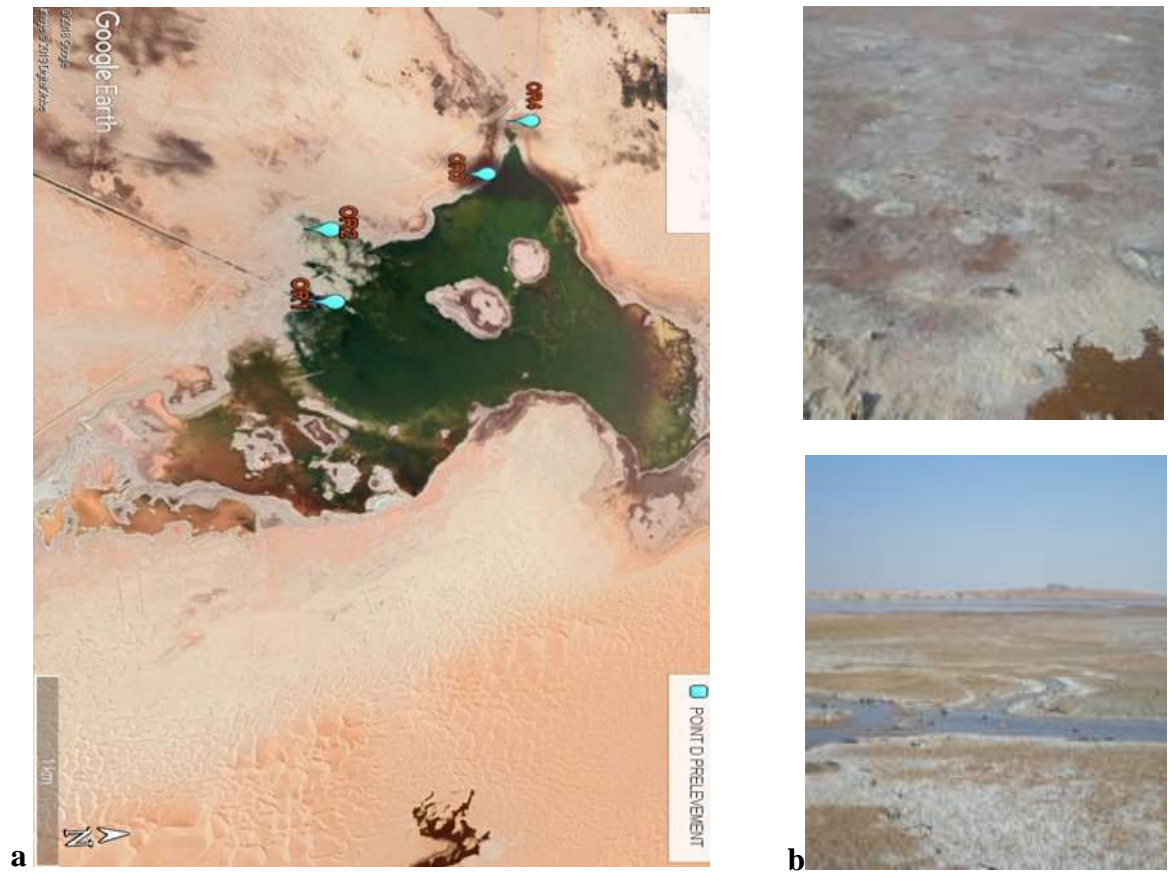


Figure 12 : Sebka Oum Eraneb positionnement des points d'échantillonnage (a) (Google Earth-2013), exemples des points de prélèvement (b)



Figure 13 : Chott Ain El Beida positionnement des points d'échantillonnage (c) (Google Earth-2013) points de prélèvement montrant le dépôt de sel (d)

➤ **La conductivité et la salinité totale (TDS) :**

La conductivité électrique (CE) est une expression numérique de la capacité d'une solution à conduire le courant électrique. Elle est mesurée pour évaluer la minéralisation globale des eaux de la *sebkha*. La plupart des sels en solution sont de bons conducteurs. La conductivité électrique standard s'exprime généralement en mil-siemens par cm (mS/cm). Elle augmente avec la teneur de l'eau en sels dissous et avec la mobilité des ions. Elle a été mesurée à l'aide d'un conductimètre modèle Delta OHM- (HD 3406.2).

La salinité découle de la présence des solutés minéraux majeurs dissouts dans les eaux ou dans les sols. C'est la mesure de la totalité des sels dissouts ou salinité totale (**Slama, 2004**).

La TDS des échantillons d'eaux des deux sites a été calculée à partir de la C_E , via la formule de conversion suivante :

$$TDS_{\text{eau}} = 0,8163CE_{\text{eau}} \text{ (Forkutsa et al., 2009)}$$

Le contenu en sel : les principaux anions (chlorures, carbonates et les sulfates) et cations (Potassium, Calcium, Magnésium et Sodium) ont été déterminés simultanément à partir des échantillons d'eaux selon les techniques décrites par Roddier (1996). Le magnésium (Mg^{2+}) par complexometrie utilisant l'éthylène diamine tétra-acéticacid (EDTA). Les carbonates (CO_3^{--}) et les bicarbonates (HCO_3^-) par colorimétrie à 497nm. Les nitrates (NO_3^-), les sulfates (SO_4^-) et les chlorures (Cl^-) par méthode colorimétrique (multi-paramètres spectrophotomètre (DR2000), à une longueur d'onde de 520nm pour (NO_3^-), 495nm pour le SO_4^- et 497nm pour le Cl^- . Le calcium (Ca^{2+}), le sodium (Na^+) et le potassium (K^+) ont été déterminés par spectrophotomètre à flamme DR 2000 (HACH) (Annexe 2).

➤ **Classification des eaux**

Le diagramme géochimique de Piper permet de représenter le faciès chimique des eaux grâce à la disponibilité des éléments majeurs de ces eaux. Il est composé de deux triangles spécifiques et un losange dans lesquels des anions et des cations d'un échantillon sont représentés. Les cotés des triangles témoignent des teneurs relatives en chacun des ions majeurs par rapport au total de ces ions. La position relative d'un résultat analytique sur chacun de ces deux triangles permet de préciser en premier lieu la dominance anionique et

cationique. Le point d'intersection sur le losange, des deux lignes issues des points identifiés, permet de préciser le faciès de l'échantillon d'eau concerné (**Piper, 1944**).

L'analyse physicochimique des échantillons de sédiments a été réalisée au niveau du Centre International des Technologies de l'Environnement de Tunis (CITET). Un prélèvement de 250gr de chaque échantillon de sédiment soumis à l'analyse, représente le mélange de 4 échantillons prélevés par point et par site. Les paramètres ont été déterminés suivant les méthodes référencées.

L'électrochimie a été appliquée aussi bien pour la mesure du pH des échantillons suivant la norme (NF T 90-008 2001), que pour la détermination de la conductivité et salinité suivant la norme (ECw EN 27 - 888 1994). Calcium et Magnésium ont été dosés par minéralisation, quant au sodium et potassium, ils ont été estimés en appliquant l'Emission Atomique-ICP suivant la norme ISO 11885 2007). Le dosage des sulfates et chlorures s'est fait par extraction selon la méthode 1/5 (10g dans 50ml d'eau). La chromatographie ionique adoptée pour le dosage des nitrates (ISO 10304-1 2007) et finalement la méthode par calcimètre de Bernard pour la mesure des carbonates.

➤ **Analyses statistiques**

Durant la période de l'étude, le faciès physico chimique des saumures et des sédiments des deux dépressions salées a été appréhendé à partir de la mesure de variables physicochimiques. Pour tirer de plus amples informations sur les corrélations qui peuvent exister entre ces paramètres, une analyse en composantes principales (ACP) de l'ensemble des données recueillies a été effectuée.

4. Recherche des bactéries halophiles cultivables

4.1. Isolement, purification et conservation des souches

➤ **Enrichissements**

Comme rapporté par plusieurs auteurs (**Kanekar et al., 2008 ; Meknaci et al., 2008 ; Hedi et al., 2009**), une technique d'enrichissement a été appliquée pour isoler les bactéries aérobies halophiles des échantillons de sédiments et de saumures prélevés.

Pour les échantillons de sédiment le milieu utilisé indiqué pour les halophiles est composé de (par litre) : NaCl : 250g ; MgCl₂·6H₂O : 13g ; MgSO₄·7H₂O : 20g ; KCl : 4g ; CaCl₂·2H₂O : 1g ; Na Br : 0,5g ; NaHCO₃ : 0,2g ; extrait de levure : 5g ; tryptone : 8g et glucose : 1g. Le pH est ajusté à 7,2 avec NaOH 4M (**Fardeau 2006; Schnegourt et Vreeland 2012**).

Pour les échantillons liquides, l'enrichissement se fait sur milieu Shegal Gibbon (1960), composé (par litre) : NaCl : 250g ; Na₂CO₃·10H₂O : 5g ; Citrate trisodique : 3g ; Casaminoacide : 7,5g ; Chlorure de potassium KCl : 3g ; Sulfate de magnésium MgSO₄ : 1g et extrait de levure : 10gr.

Ainsi, 10g de sédiments ou 10ml d'échantillons de saumure sont ajoutés à 90ml du milieu d'enrichissement approprié, (Annexe 2) transférés par la suite dans des Erlenmeyer de 250 ml qui seront incubées sous agitation (150 tours/min) pendant 7 jours.

L'isolement des souches bactériennes halophiles est effectué sur les milieux HM (Halophilic Medium) utilisés précédemment pour enrichissement additionnés de 20g d'agar chacun, et ajustés aux pH 7 et 7.2.

0,1ml de la solution mère et des dilutions (10^{-2} - 10^{-4}) sont étalées sur les mêmes milieux. Après deux semaines d'incubation, des colonies pigmentées (rouges, oranges, roses, jaunes, crèmes, blanches) ou transparentes apparaissent et feront l'objet de l'étude.

L'incubation des milieux liquides et solides se fait à 37°C, température largement utilisée pour isoler des bactéries diverses à partir d'environnements hypersalins (**Maturano et al., 2006; Wen et al., 2009**).

➤ **Numération bactérienne**

L'estimation est basée sur le comptage direct du nombre moyen de bactéries. Les colonies bactériennes obtenues sont comptées pour chaque dilution et rapportées à 1ml d'eau et à 1g de la suspension de chaque échantillon.

➤ **Purification et conservation**

Les colonies bien isolées et morphologiquement distinctes sont purifiées sur les mêmes milieux gélosés en appliquant la méthode des stries. Les bactéries sont maintenues sur gélose inclinée à +4°C et repiquées tout les trois mois.

L'étude des halobactéries aérobies comme suggérée par **Oren et al., (1997)** devrait contenir un ensemble de données aussi complet que possible, y compris les propriétés phénotypiques, chimiques et moléculaires.

4.2. Caractérisation phénotypique

Les critères considérés lors de l'observation macroscopiques des colonies obtenues sont : l'aspect, la chromogénèse, l'opacité, l'élévation et le diamètres (**Asha et al., 2005**).

➤ **Coloration de Gram**

La technique appliquée est celle de Dussault (1955) indiquée pour les souches halophiles. Une suspension bactérienne dense est étalée sur lame, séchée à l'air puis fixée à l'acide acétique à 2% pendant 5 min. L'excès de l'acide est rejeté, après séchage, le frottis est recouvert d'une solution de violet de Gentiane pendant 3 minutes, rincé à l'eau puis recoloré à la fuchsine pendant 1min 30, la lame est rincée à l'eau distillée, séchée puis examinée.

➤ **La microscopie**

Réalisée au Laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB), Paris-France, à partir de cellules en cultures sur bouillon Yeast extract-Peptone-Casamino acids (YPC), contenant (par litre) : Extrait de levure : 5g, peptone (Oxoid) : 1g, casaaminiacide : 1g, NaCl : 144g, $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$: 18g, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$: 21g et KCl : 4,2g. pH 7,5.

- 5 μ l de culture déposée sur une fine couche d'agarose 1% contenant les sels du 'YPC' dans les mêmes proportions.
- Une fois la goutte séchée on observe avec un microscope optique champ large, en utilisant un objectif 40X à huile avec une ouverture numérique 1.4, en DIC (Contraste Interférentiel Différentiel, ou contraste « Nomarski »).
- Les barres d'échelle sur les images correspondent à 10 μ m.

4.3. Etude Physiologique

Cette étude est réalisée par ensemencement des milieux solides, pour déterminer l'optimum de croissance des isolats et voir l'influence des trois paramètres : température, pH et concentration en sel. Des milieux solides sont préparés, en variant un paramètre à la fois, les conditions optimales de croissance sont déterminées visuellement.

➤ **Le pH**

Le pH optimal de croissance est déterminé par ensemencement des souches sur milieux solides contenant la concentration optimale en NaCl. Les pH testés vont de 5-9,5 (à intervalle de 0.5) (**Perez-Davo *et al.*, 2014**). Les pH sont ajustés par addition de HCl 1M ou NaOH 4M (**Kharroub *et al.*, 2007**).

➤ **La température**

Ensemencés par 0,1 ml de culture, l'incubation des milieux est réalisée à 5°C, 10°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C, 40°C, 45°C et 50°C (**Usami *et al.*, 2007**).

➤ **La salinité**

Dans le but de classer nos isolats selon leur comportement vis-à-vis du sel, les milieux de base solides ajustés à pH 7 et 7,2, sont additionnés de NaCl à différentes concentration : 0, 5, 10, 15, 20, 25 et 30% (p/v). L'incubation se fait à 37°C pendant 7 jours (**Asha *et al.*, 2005**). La meilleure croissance obtenue correspond à la concentration optimale.

➤ **Détermination de l'optimum de magnésium**

La détermination de la concentration minimale de magnésium nécessaire pour la croissance est réalisée sur les milieux solides additionnés de quantités variables de MgCl₂ : 0 ; 0,005 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 3,2% (p/v) (**Rodriguez-Valera *et al.*, 1983**).

4.4. Métabolisme respiratoire

➤ **Recherche de la cytochrome-oxydase**

La recherche de la cytochrome-oxydase a été effectuée à l'aide de disques «Ox» dont la zone réactionnelle est composée d'un papier filtre imprégné de N,N-diméthyl-1,4-phénylène diamine-dichlorure.

Une colonie est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et déposée sur un disque oxydase placé sur une lame. La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (**Joffin et Leyral, 2006**).

➤ **Catalase**

Sur une lame propre déposer une goutte de peroxyde d'hydrogène, la mettre en contact avec la colonie isolée et prélevée à la pipette Pasteur stérile. L'apparition immédiate de bulles gazeuses indique une réaction positive (**Toreblanca et al., 1986**).

➤ **Nitrate réductase**

La capacité de croissance en anaérobiose comprend l'utilisation d'un accepteur d'électrons alternatif comme les nitrates. Dans cette perspective, des tubes contenant 20ml des milieux utilisés pour l'isolement, sont additionnés de 0,1ml (w/v) de KNO₃ plus la cloche de Durham (**Vreeland, 1993**). Les milieux sont ensemencés avec 0.1ml à partir des cultures bactériennes, puis incubés à 37°C pendant 5-7 jours. Après ajout de quelques gouttes du réactif I et II des nitrates, le résultat positif se traduit par l'apparition d'un anneau rougeâtre, qui signifie nitrate réductase positive (**Tindall et al., 1984**).

➤ **Mannitol mobilité**

C'est une gélose molle conditionnée en tubes qui permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries. L'ensemencement est réalisé par piqûre centrale jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une pipette Pasteur. La fermentation du mannitol se matérialise par un virage du milieu au jaune. Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble dans le milieu alors que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement (**Gerhardt et al., 1994**).

➤ **Dégradation de la caséine et cellulose**

Comme il était intéressant de rechercher la capacité des souches à produire des exoenzymes, les tests se sont concentrés sur l'hydrolyse de la caséine et de la cellulose. Les deux milieux d'isolement dépourvus de casaminoacides, contenant 1g d'extrait de levure, sont additionnés de 0,1% (p/v) de caséine ou de cellulose. Solidifier avec 20g/l d'agar, ces milieux sont ensemencés par stries et incubés 7 jours à 37°C. La présence de cette activité est détectée par un halo clair autour des colonies indiquant une hydrolyse de la caséine ou de la cellulose (**Roxana et al., 2009**).

➤ **Dégradation de la gélatine**

La dégradation de la gélatine a également été considérée, déterminée sur les milieux liquides sans casaminoacides, additionnés de 12% de gélatine et de 1g d'extrait de levure. Au bout de 14 jours à 37°C, les tubes sont placés à 4°C durant 25min pour examiner la liquéfaction de la gélose témoignant de la dégradation de la gélatine (**Tomilson et Hochstein, 1976**).

➤ **Hydrolyse de l'esculine**

Ce test a été réalisé sur le milieu gélosé contenant la bile à esculine. L'hydrolyse de l'esculine libère l'aglycone qui est décelé par une réaction chimique en présence de sel de fer en donnant une couleur noire au milieu de culture (**De Vos et al., 2009**).

➤ **Activité lipolytique**

Sur les milieux préparés sans extrait de levure et sans casaminoacides, additionnés de 1g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et de 1ml de tween 80 (v/v). Les souches sont ensemencées en spots et incubées 30 jours à 37°C. Une croissance bactérienne traduit une activité lipolytique (**Noris et Ribbons, 1971 ; Gonzales et al., 1978**).

➤ **Production d'indole**

Les deux milieux ayant servis pour l'isolement, mais dépourvus d'agar, sont additionnés de tryptophane puis répartis en tubes de 10ml. Après ensemencement, ils sont incubés 7 jours à 37°C. L'apparition d'un anneau rouge après addition de quelques gouttes du réactif de Kovacs confirme la production d'indole (**Takashima et al., 1990**).

➤ **Production d'H₂S**

Le milieu Hajna-Kligler déshydraté, additionné de 25% de NaCl, est coulé en pente et culot. Ensemencé après solidification, en stries et incubé à 37°C pendant 7 jours. Ce milieu permet à la fois la mise en évidence de la fermentation du glucose, dégradation du lactose et production de gaz et d'H₂S. Le précipité noir indique la réaction positive recherchée (**Rodriguez et al., 1998**).

➤ **Utilisation des substrats carbonés**

Les milieux solides dépourvus de toute source organique, sont additionnés de NH_4Cl (0,5g/l), de KH_2PO_4 (0,005g/l) de tampon dont le pH est ajusté à 7. Les substrats à tester sont rajoutés à une concentration finale de 1% pour les sucres et 0,1% pour les alcools, les acides organiques et les acides aminés (**Oren *et al.*, 1997**).

➤ **Utilisation du glucose comme unique source de carbone**

Les souches sont ensemencées sur ce milieu contenant par litre : citrate trisodique : 3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1g, KCl : 2g, NaCl : 250g, NH_4Cl : 2g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: 1g, glucose : 10g et pH : 7. Incubation 5-7 jours à 37°C (**Rodriguez-Valera, 1980 ; 1983**).

D'autres tests biochimiques ont été réalisés en utilisant des galeries API 20E qui comportent 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne assez dense. Les réactions produites pendant la période d'incubation de 7 à 21 jours à 37°C se traduisent par des virages de couleur spontanés ou par l'addition des réactifs.

4.5. Sensibilité aux antibiotiques

Cette étude est réalisée sur milieu Muller-Hinton avec 10% NaCl (**Amoozegar *et al.*, 2006**; **Perez-Davoet *et al.*, 2014**). Les antibiotiques testés sont recommandés par **Tindall (1992)** ; **Oren *et al.*, (1997)**; **Duckworth *et al.*, (2000)** et **Birbir *et al.*, (2004)** : la bacitracine (10 μg), la streptomycine(10UI), le chloramphenicol (30 μg), l'erythromycine (15 μg), la pénicilline G (10UI/30 μg), la novobiocine (30 μg), l'ampicilline (10 μg : 30 μg), la tetracycline (30UI), l'acidenalidixique (30 μg), la vancomycine (30 μg), la gentamycine (10 μg), la ciprofloxacine (5 μg) et la kanamycine (30 μg).

La souche est considérée sensible si la zone d'inhibition dépasse au moins deux mm autour du disque après 14 à 21 jours d'incubation à 37°C (**Bonelo *et al.*, 1984**).

5. Caractérisation phylogénétique

Le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S a été réalisé au niveau du Laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB), Paris-France. Le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S s'effectue selon plusieurs étapes.

L'ADN des souches isolées purifiées (cultures) a été extrait en utilisant du NucleoSpin Tissue de Machery-Nagel selon les recommandations du fabricant. Le gène codant l'ARN ribosomal 16S de chaque souche a été amplifié par PCR standard en utilisant l'ADN polymérase Q5 High-Fidelity de NEB dans son tampon optimisé pour une teneur élevée en GC.

Des amorces universelles ont été utilisées :

- 21F (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3') et 1404R (5'-GGGTGTGTGCAAGGRC-3'), spécifiques des archées,

- 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') et 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') spécifiques des bactéries

Pour chaque souche à tester, une colonie isolée a été resuspendue dans 100 µl d'eau stérile, puis 1 µl a été utilisé comme matrice lors de la PCR.

Après un premier cycle de dénaturation de l'ADN de trois minutes à 98°C, trente cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation de dix secondes à 98°C, une étape d'hybridation des amorces à 55°C puis une étape d'élongation d'une minute à 72°C, sont réalisés. Puis un dernier cycle d'élongation de cinq minutes à 72°C est réalisé. 5µl des produits PCR obtenus ont été analysés sur un gel d'agarose à 1% (w/v). Le produit de PCR spécifique obtenu a alors été extrait du gel en utilisant le kit d'extraction d'ADN (ThermoFischer) puis envoyé au séquençage (Eurofins).

La séquence du gène codant l'ARN ribosomal 16S de chaque souche a été comparée par l'intermédiaire de Microbial Nucleotide BLAST sur le site suivant : http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC = Microbial Genomes).

Résultats et discussion

« Face à la roche, le ruisseau l'emporte toujours, non par la force, mais par la persévérance ».

H. Jackson Brown

1- Les conditions climatiques

1-1-La température

La température est un élément fondamental du climat. Elle est liée à la radiation solaire. Sa variation influe sur la transformation des eaux en vapeur, que ce soit à la surface ou dans le sous-sol. De ce fait, elle influe sur le degré d'évapotranspiration et agit par conséquent sur le taux de salinité des eaux (**Hacini et al., 2012**). La température moyenne annuelle à Ouargla, est de 23,47°C. Les mois les plus chauds et les plus froids sont respectivement : Juillet avec une température moyenne de 36,7°C et Janvier avec une température de 10,8°C.

1.2. La pluviométrie

Les précipitations sont rares et irrégulières comme dans la majeure partie des régions sahariennes. La moyenne annuelle de la précipitation est de 3,19 mm, avec un maximum de 15,66 mm en Janvier et un minimum de 0,34 mm en Mai 2013 (Tableau 7). La répartition annuelle des pluies est caractérisée par une période d'absence presque totale de précipitations qui s'étend durant plusieurs mois.

1.3. L'évaporation

L'évaporation est définie comme étant le passage de l'état liquide à l'état gazeux à une température au dessus du point d'ébullition. L'évaporation est conditionnée par des facteurs météorologiques tels que : la température, l'humidité relative du vent, l'insolation et la pression atmosphérique (**Godard et Tabeaud, 1993 ; Réméniéras 1999**) et des facteurs physiques : profondeur du plan d'eau, son étendu et sa salinité (**Réméniéras, 1999; Musy, 2004**).

L'établissement d'un bilan hydrique des surfaces des plans d'eau (*chott* ou *sebkha*) exige la connaissance de la valeur de l'évaporation.

L'évaluation de l'évaporation en Algérie est effectuée à partir des stations expérimentales équipées de bacs d'évaporation ou bien par analogie avec les plans d'eau (barrages et retenues collinaires) qui sont toujours mesurés afin d'établir des bilans d'eau de ces ouvrages.

On a eu toujours recours à l'application des formules qui relient l'évaporation aux éléments météorologiques (Annexe 3).

1.4. L'humidité de l'air

Elle est faible en période estivale, d'une moyenne de 27 % (Juillet, Aout), vu que les températures moyennes sont élevées en ces périodes. En saison froide l'humidité atteint une moyenne maximale de 65% au mois de Janvier.

Tableau 7 : Evaporation du plan d'eau des deux sebkhas (Année 2013)
(Méthode de Boutoutaou)

Mois	<i>n</i>	<i>t, °C</i>	<i>H%</i>	<i>D, mb</i>	<i>V, m/s</i>	<i>V₂, m/s</i>	Evaporation <i>E, mm</i>
janvier	31	10,8	65	4,4	2,7	2,1	67
Février	28,5	10,3	59	5,0	3,0	2,3	70
Mars	31	16,6	53	8,5	3,5	2,7	121
Avril	30	22,4	41	15,3	4,0	3,1	195
Mai	31	27,6	33	24,0	4,3	3,3	290
Juin	30	35,3	30	41,3	3,8	3,0	393
Juillet	31	36,7	26	47,7	3,6	2,8	440
Aout	31	35,1	28	41,7	3,6	2,8	395
Sep	30	30,0	33	28,2	3,3	2,5	275
Oct	31	25,8	39	19,8	3,1	2,4	213
Nov	30	19,1	54	9,8	2,4	1,8	110
Déc	31	11,8	58	5,7	2,8	2,1	81

2. Analyses physicochimiques des saumures et sédiments des deux sebkhas

L'objectif de notre étude est l'isolement et la caractérisation de la flore bactérienne halophile répondeur dans les dépressions salées d'Oum Eraneb et Ain El Beida, situées dans le Sahara algérien.

Cette étape fut précédée par l'analyse physico-chimique des échantillons de saumures et de sédiments prélevés au niveau des deux sites dont les résultats sont portés en annexe 4.

La composition ionique et le degré de salinité des deux *sebkhas* sont résumés dans le tableau 8, permettant ainsi de les comparer à d'autres écosystèmes hypersalins aquatiques et terrestres du monde.

Situés dans le Sud-est du Sahara algérien, la salinité des deux sites dérive de la dissolution des sels d'origine continentale. Par conséquent, les eaux de ces *sebkhas* peuvent être considérées comme athalassohalines. La composition athalassohaline reflète la composition de la géologie environnante, la topographie et les conditions climatiques, particulièrement affectées par la dissolution des gisements minéraux. La composition de ces eaux varie donc largement **(Rodriguez-Valera, 1988)**.

La température étant un facteur très important pour le fonctionnement des ces écosystèmes, sa variation au moment de l'échantillonnage entre 17°C à Oum Eraneb et 18°C à Ain El beida agira sans doute sur les réactions métaboliques qui se produisent dans l'eau de ces lacs.

Les températures des saumures oscillent entre 5°C au mois de Mars et 25°C au mois de Juin, à Oum Eraneb et entre 9,5°C au mois de Mars et 25°C, le mois de Mai à Ain El Beida.

L'évolution de la température d'un lac salé reste liée aux conditions locales telles que le climat régional, la topographie, la durée de l'ensoleillement, le débit et la profondeur **(Mc Neely et al., in Hacini et al., 2012)**.

La température de l'eau joue un rôle important dans la solubilité des sels et des gaz en outre l'oxygène nécessaire à l'équilibre de la vie aquatique. Par ailleurs, la température accroît les vitesses des réactions chimiques et biochimiques d'un facteur de 2 à 3 pour une augmentation de la température de 10°C **(Rodier, 2005)**.

Le pH constitue une mesure de la concentration des ions H^+ dans l'eau, qui varient légèrement avec la température, les saisons et les périodes d'activités biologiques. Neutres à basiques, les valeurs du pH des saumures enregistrées au cours de la période d'étude, oscillent entre 7,47 et 9,58 à Oum Eraneb et 7,41 à 9,9 à Ain El Beida. Ces échantillons reflètent une alcalinité avec des valeurs moyennes de pH allant de 8,57 à 8,74 (Tableau 8).

En guise de comparaison, ce pH est inférieur à ceux enregistrés à Chott Melghir : 7,56 à 10,45 **(Amarouche et al., 2006)** et Oued Righ pH 9,35 **(Ayad et Kharroub, 2012)**, similaire à celui du chott El Jerid **(Gueddari, 1983)**, se rapproche de ceux rapportés du Lac El Golea, Sambhar Salt Lake SSL (Inde), dépasse les valeurs relevées au niveau de sebkha Ezzemoul (Oum Bouaghi) pH : 7,53 **(Kharroub, 2006)** et des lacs salés algériens précédemment décrit Sidi Ameer, Himalatt **(Boutaiba et al., 2011)**.

En contre partie, des lacs salins des Andes au Nord du Chili présentent des pH acides, de l'ordre de 1,3 à 4,17. (**François et al., 2002, in Hacini et al., 2012**). D'après **Hacini (2006)**, cette différence de pH dans les différents lacs trouve son origine dans la nature des apports et la nature des terrains lessivés avant d'arriver au lacs. Suivant **Diallo (1996)**, les eaux riches en calcaires ont un pH élevé et celles provenant des terrains pauvres en calcaire ou siliceux ont un pH voisin de 7.

Tableau 8 : Propriétés physico-chimiques de sebkha Oum Eraneb et Ain El Beida comparés à d'autres écosystèmes salés terrestres et marins ^a

Ecosystèmes	Propriétés physico-chimiques								
	pH	Na ²⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	So ₄ ²⁻	HCO ³⁻	Salinité
Solar saltern hyper saline	Nd	65,4	2,5	20,1	0,2	144	1,9	nd	254
Le Grand Lac Salé UTAH (USA)	7,7	105	6,7	11,1	0,3	181	27	0,72	333
Lac Assal (Djibouti)	n.d	77,8	5,4	8	14,6	164	2,3	n.d	277
Mer Morte	7,8	40,1	7,6	44	78,2	225	0,44	0,26	340
Wadi Natrun (Egypte)	11	142	2,3	ND	ND	155	22,6	67	394
Lac salé Sambhar SSL (Inde)	9	37,5	0,50	0,00	0,00	21,46	6,00	1,94	/
Solar saltern Sfax (Tunisie)	7,55	87,5	8,5	0,29	0,043	261,09	43,2	nd	376,6
Lac Salé El Golea (Algérie)	9	107	nd	0,3	0,4	198	nd	nd	296
SidiAmeur (Algérie) Eau	7,4	67,1	0,17	3	0,51	111	2,1	0,19	200
SidiAmeur (Algérie) sédiment	7,15	94,5	0,23	29	1,7	170	1,1	nd	nd
Himalatt (Algérie) eau	7,2	24,5	0,12	1,6	0,22	63,8	3,1	nd	117
OumEraneb (Algérie) eau	8,57	37,33	1,71	4,04	5,63	64,68	41,22	0,43	128
Oum Eraneb (Algérie) sédiment	8,32	27,6	2,52	22,27	24,32	39,15	30,32	/	1,71
Ain El Beida (Algérie) eau	8,74	71,77	1,91	10,02	7,35	112,31	51,03	0,43	165
Ain El Beida(Algérie) sédiment	8,65	50,4	3,98	26,85	11,37	55,2	69,92	/	2,26
Mer Aral	8,2	2,2	0,08	0,55	0,51	3,47	3,2	0,07	10,2
Mer Caspienne	8,3	3,18	0,09	0,73	0,34	5,33	3,0	0,4	12,8
Ocean Atlantic	8,5	10,6	0,38	1,29	0,42	19,2	2,68	0,14	34,85

^a Salinité et ions sont représentés en g l⁻¹, n.d. non déterminé. N.D., Non-déecté.

Les références pour les caractéristiques abiotiques d'autres habitats hypersalines et marins sont les suivantes (Imhoff *et al.*, 1979; Post, 1981; Copin-Montègut, 1996; Gavirieli, 1997; Oren, 2002; Hacene *et al.*, 2004; in Boutaiba *et al.*, 2011; Upasani *et al.*, 1990; Trigui *et al.*, 2011).

Sous un climat aride, les *sebkhas* d'Oum Eraneb et Ain El Beida sont sujettes à une évaporation des eaux de surface. La rareté des averses et la quantité annuelle moyenne des précipitations (3,19 mm/an) dans cette zone induisent un déficit hydrique accentué par l'évaporation plus importante que l'humidité. L'élévation de la température est le principal facteur d'une évaporation intense durant l'été (Figure 14), qui augmente les concentrations de sels dans les eaux des *sebkhas* ; à l'origine de leur accumulation dans les horizons superficiels.

Les échantillons de saumures analysés au niveau des deux sites sont dominés par les ions Na^{2+} et Cl^- . Comme souligné par **Litchfield (1998)**, les lacs alcalins hypersalins présentent une autre composition ionique avec la prédominance des chlorures et des cations Na^+ . Néanmoins les proportions des sels dans ces saumures sont différentes de celles de l'eau de mer.

En effet, comparés à celles de l'Océan Atlantique, les concentrations de sodium et de chlorure sont 6 fois plus élevées à Ain El Beida et 3 fois plus élevées à Oum Eraneb. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par **Pipkin et al. (1977)**, **Amarouche et al. (2006)** et **Boutaiba et al. (2011)** sur les milieux hypersalins où le chlore et le sodium sont les plus représentés à des pourcentages respectifs de 55,04% et 30,61%.

A titre indicatif, la salinité du *chott* Merouane atteint les 347,62g/l, celle de *sebkha* Moknine 130,62 g/l, elle est de l'ordre de 140 g/l au lac Sinai (**Hacini, 2006**).

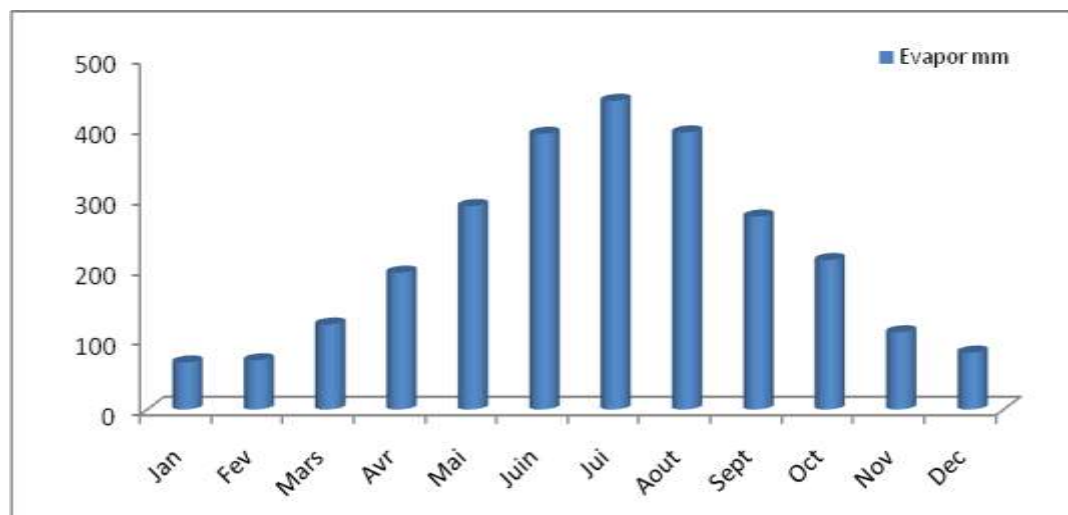


Figure 14: Evaporation des deux plans d'eau-Ain El beida et Oum Eraneb (année 2013).

Les éléments majeurs dans les échantillons de saumures

Dominant dans les échantillons de saumures analysés, l'ion chlorure possède des caractéristiques différentes de celles des autres éléments.

En effet, il ne se combine pas facilement avec les éléments chimiques et reste très mobile (**Hacini et al., 2012**), ce qui expliquerait les taux élevés retrouvés dans les échantillons de saumure des deux *sebkhas*. Loin tout de même du taux relevé de *chott* Melghir (5,5-393g/l) (**Amarouche et al., 2006**), la concentration en chlorure oscille entre 20,78 et 130,56 g/l dans les saumures du site 1 : Oum Eraneb et atteint en période chaude de l'année un maximum de 149,40 g/l au niveau du site 2 : Ain El Beida (Figure 15). Une valeur exceptionnelle a été relevée le mois de Février, qui peut être allouée aux facteurs externes, essentiellement les eaux d'irrigations et des eaux de rejet.

Le sodium est un élément constant de l'eau toutefois les concentrations peuvent être extrêmement variables. Indépendamment de la lixiviation des formations géologiques contenant du chlorure de sodium, cet ion peut provenir de la décomposition des formations évaporitiques comme l'halite (**Saker et al., 2012**).

Les concentrations des saumures en sodium varient entre 9,14 g/l à Oum Eraneb au mois de Mars et 106,66 g/l au mois de juin (Figures 15-16), se rapprochant du taux de (112,76g/l) relevé par **Yahiaoui et al. (2012)** à *chott* El Beida (Setif). Un minimum relevé à Ain El Beida en janvier ; 22,37 g/l avec des concentrations élevées enregistrées durant la période sèche.

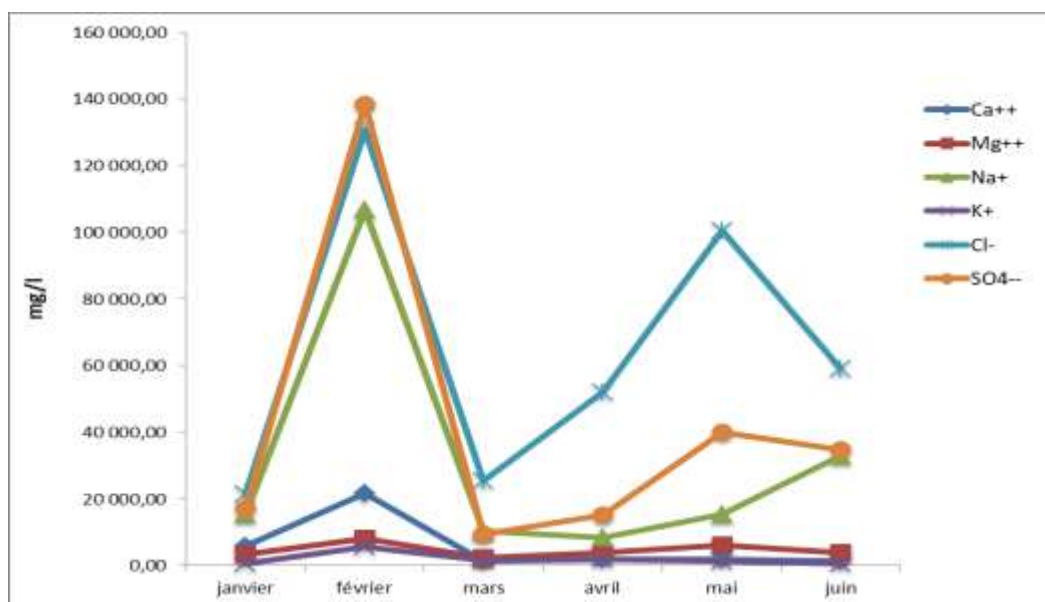


Figure 15: Variation de la concentration en éléments majeurs dans les saumures de *sebkha* Oum Eraneb : Janvier-Juin 2013.

Les teneurs du Ca^{2+} évoluent de la même manière au niveau des chotts. Les concentrations pour l'ensemble des échantillons de saumures sont comprises entre 5,63 et 7,35g/l.

Si ces concentrations sont supérieures à la plupart des écosystèmes hypersalins rapportés dans le tableau comparatif (n°8), elles demeurent inférieures à celles indiquées à Chott Melghir (2-22,3 g/l) (Amarouche *et al.*, 2006), au Lac Assal-Djibouti (14,6g/l) et à la Mer Morte (78,2 g/l) (Gerday et Glansdorff in Boutaiba *et al.*, 2011)

D'après Grant *et al.* (1989, 1992) il existe deux types d'environnements alcalins stables naturels dans le monde. Premièrement, les environnements à haute teneur en Ca^{2+} (eaux souterraines à forte teneur en $\text{Ca}(\text{OH})_2$ et les seconds à faible teneur en Ca^{2+} (les lacs à soda et les déserts qui sont dominés par le carbonate de sodium).

Les concentrations en ions Mg^{2+} sont comparables à celles du calcium ; elles se situent entre 1,83 et 8,19g/l au niveau du site 1, et atteignent 29,05g/l au niveau du site 2, dépassant de loin le bilan de Chott Melghir pour le magnésium (0,3-7,2g/l) (Amarouche *et al.*, 2006).

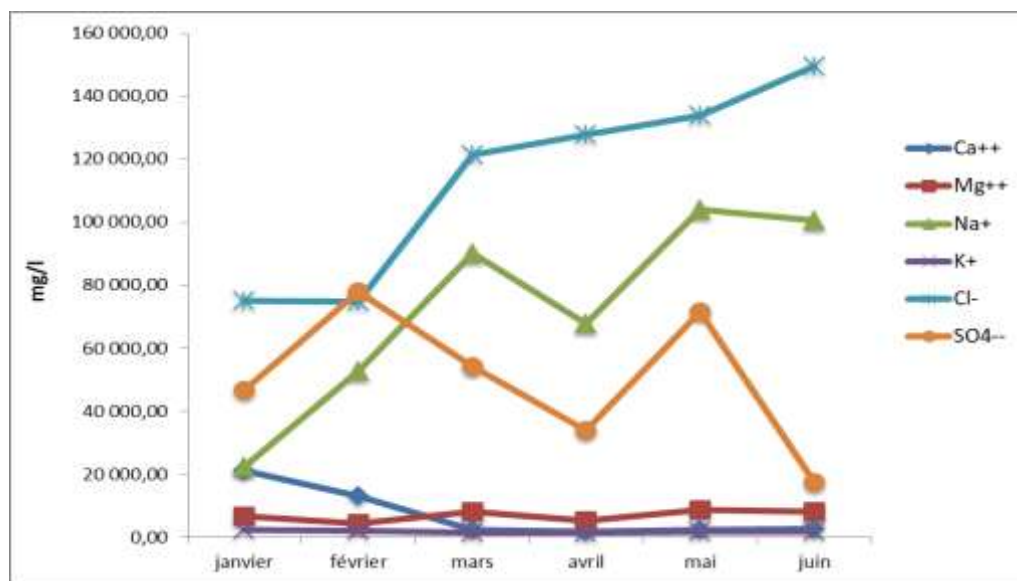


Figure 16: Variation de la concentration en éléments majeurs dans les saumures de chott Ain El Beida : Janvier-Juin 2013

Le magnésium est l'un des éléments les plus répandus dans la nature, il constitue environ 2,1% de l'écorce terrestre. Comme les ions de calcium, les ions Mg^{2+} proviennent de la dissolution des formations carbonatées (calcaire) parfois riches en magnésium. En plus, la plupart des sels magnésiens sont très solubles dans l'eau.

La teneur en magnésium dépend de la composition des roches sédimentaires rencontrées (**Marlet et al., 2006 ; Saker et al., 2012**).

Le potassium résulte de l'altération des argiles potassiques, sa concentration varie entre (0,81-5,5) mg/l à Oum Eraneb et (1,80-2,52 mg/l) à Ain El Beida. Une certaine homogénéité des teneurs en potassium est observée au niveau des deux sebkhas, durant la période d'étude.

Les sulfates évoluent pratiquement de la même manière au niveau des deux sites, on observe des pics au mois de février (138,25g/l au site1 et 77,92g/l au site 2), suivie d'une diminution vers la fin de la période d'échantillonnage, probablement due à la précipitation des sels sulfatés.

En dépit des valeurs similaires en sulfates retrouvées à *sebkha* Oum Eraneb et la station solaire de Sfax (Tunisie), les échantillons de saumures des deux *sebkhas* sont significativement plus abondants en (SO_4^{2-}) que l'ensemble des écosystèmes hypersalins décrits (Tableau 8), mais également en comparaison au Lac Maras au Pérou (4,65g/l) (**Maturano et al., 2006**), aux Lacs hypersalins Jhapag et Deodani en Inde (26,53/22,68g/l) (**Upasani et al., 1990**).

Ces quantités importantes peuvent provenir de la dissolution du gypse, contenu dans les différentes formations, de l'oxydation des sulfures et du lessivage des engrais, dans les périmètres agricoles avoisinant les dépressions.

Les conditions climatiques, le contexte hydrologique (précipitations, ruissèlements de surface, apport d'eaux souterraines) et les sorties (évaporation, de vidange, pertes) sont autant de facteurs qui selon **Gonzalo et al, (2006)**, déterminent la teneur en sel des saumures.

2.1. Diagramme de Piper

Pour déterminer le faciès chimique des eaux prélevées des sites étudiés, les données physicochimiques ont été soumises au préalable à une balance ionique : **RokWare Aq.QA Version Démo 1.1 [1.1.4.1]** (Prairie City Computing, Inc, 2005), puis traitées à l'aide du logiciel **v.6.52** (Roland SIMLER, Laboratoire d'Hydrogéologie d'Avignon, 2017). <http://www.lha.univ-avignon.fr/LHA-Logiciels.htm>).

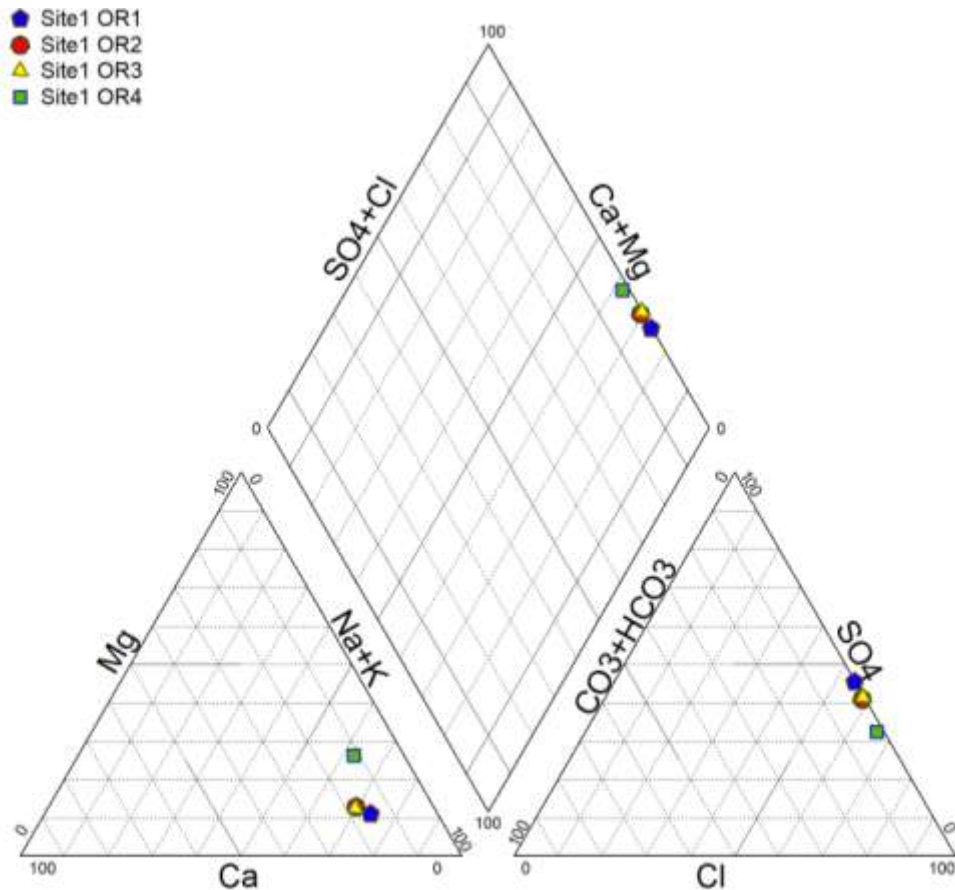


Figure 17: Diagramme de Piper des eaux du site 1 : Sebkhha Oum Eraneb

La projection des eaux de *sebkhha* Oum Eraneb dans le diagramme de Piper, détermine leur faciès chimique et montre que :

Site 1 point de prélèvement (OR4) : Chloruré sodique potassique, plus abondant en ions magnésium.

Les points (OR1-OR2 et OR3) : Chlorurés sodiques plus chargés en ions sulfates.

La figure 18, révèle que la station de prélèvement (AB1) est plus riche en sulfates, tandis que les autres stations du site 2, sont plus abondantes en chlorures, potassium et sodium. Suivant le diagramme correspondant, les eaux de la seconde dépression salée, sont chlorurées sodiques et potassiques, conclusion rapportée en 2008, par **Djidel**, qui détermina que les eaux du *chott* de Ain El Beida sont chlorurées sodiques à hyperchlorurées.

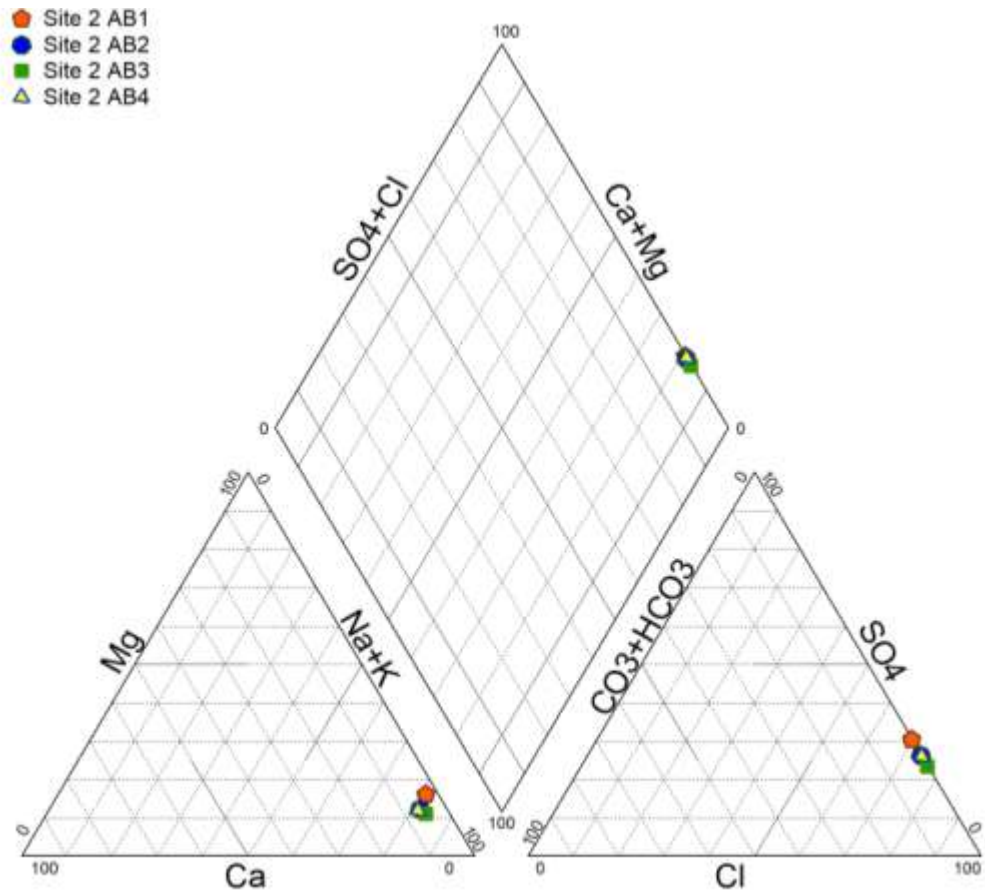


Figure 18: Diagramme de Piper des eaux du site 2 : *chott* Ain Elbeida

Les éléments majeurs dans les échantillons de sédiments

Lorsque le sodium domine dans l'eau, on parle de « salinité » et lorsqu'il domine accroché à l'argile on parle de « sodicité ». La salinisation est un phénomène par lequel un sol devient sursalé. Elle résulte le plus souvent de l'irrigation de sols mal drainés, accentuée par la forte évaporation sous climat aride. Le sol salin contient donc un excès de sels solubles tels que : le potassium, le magnésium, le calcium, le chlorure, le sulfate, le carbonate, le bicarbonate et le sodium (Legros, 2009).

Le dosage de ces éléments dans les échantillons de sédiments prélevés des deux sites, laisse apparaître les profils illustrés dans les figures (19 et 20).

Ainsi du point de vue spatial, la salinité et sa variabilité n'est pas la même pour les quatre stations, par *sebkha*. Au niveau site1, les stations d'échantillonnage 3 et 4 les plus retirées affichent les taux de salinité les plus élevés, (2,35-2,11%). Les ions les plus abondants sont les chlorures (73,5g/kg MS-OR3), avec un écart type de 24,85. Le sodium (47,7g/kg MS-OR3) et un écart type de 13,70 et les sulfates (35,6 7g/kg MS-OR1).

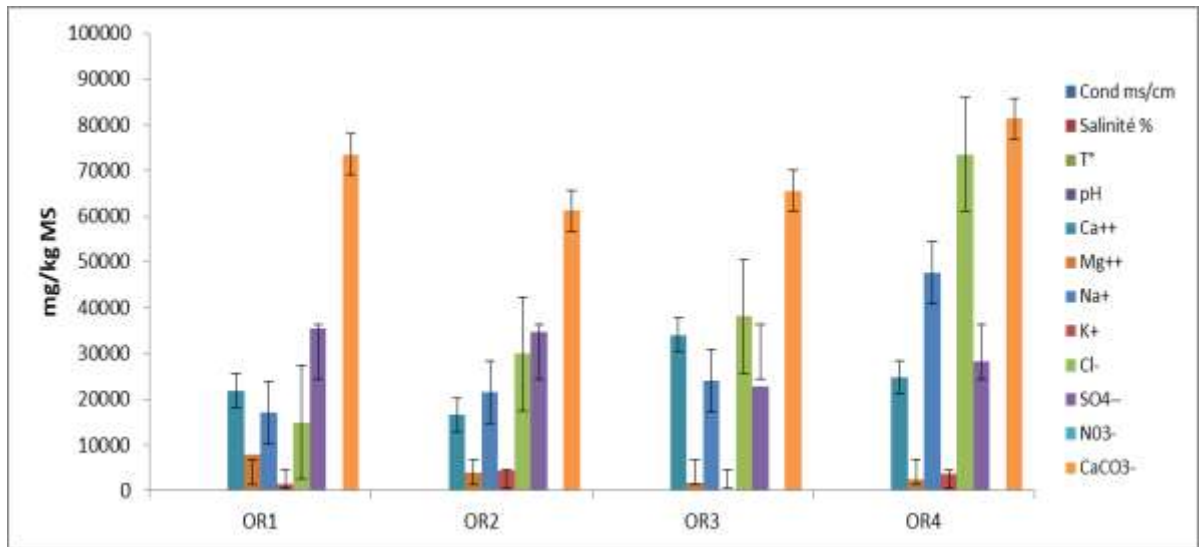


Figure 19: Répartition des éléments majeurs dans les sédiments *sebkhah* Oum Eraneb

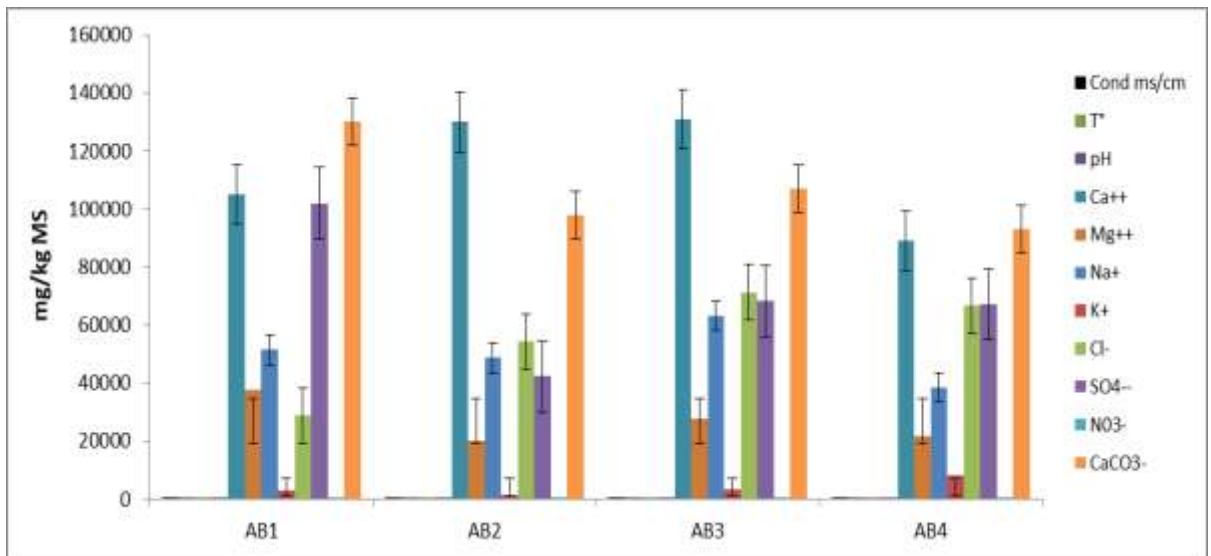


Figure 20: Répartition des éléments majeurs dans les sédiments *chott* Ain El Beida

Au niveau du second site, figure ci-dessus, certains éléments plus que d'autres signalent leur abondance. Il s'agit en outre du calcium avec une moyenne de 113,72g/kg MS, des chlorures avec une moyenne de 55,2g/kg MS (les taux rapprochés AB3-AB4) et un écart type de 19,08. Le sodium 50,4g/kg MS en moyenne et les sulfates 69,92g/kg MS (24,51 écart type). Les carbonates de calcium apparaissent aux niveaux des deux sites avec des taux anormalement élevés, ce qui nous laisse penser qu'il s'agit de précipités carbonatés.

La conductivité électrique (CE) est l'index d'usage pour évaluer la salinité d'un sol. Basée sur le concept de la quantité de courant électrique portée par une solution salée dans les

conditions standards, la CE augmente au fur et à mesure que la concentration en sel de la solution augmente (Saker *et al.*, 2012).

Dans notre étude les valeurs de la CE vont de 18,4 à 37,7 avec une moyenne de 27,7 (mS/cm) et un taux de salinité de 1,71% à Oum Eraneb. Elle fluctue entre 28,5 et 41,7 avec une moyenne de 34,82 (mS/cm) et un taux de salinité de 2,26, % au niveau Ain El Beida. Des résultats qui nous permettent de qualifier les sols des deux sites d'hyper salés (Tableau 09).

Le pH monte dans les sols salés, parfois jusqu'à 10 et même plus, ce qui fait périr les plantes, on parle alors de sol alcalin. Le pH des sédiments récoltés au niveau du site 1 varie entre 8-8,8, il est entre 8-9 au niveau du site 2, renseignant d'une alcalinisation. Des valeurs de pH similaires ont été relevées du sol de Regane et Oued Righ (8,6- 8,8) respectivement (Amarouche *et al.*, 2006 ; Ayad et Kharroub, 2012), ainsi que du Lac salé Bolluk (8,59) en Turquie (Ozscan *et al.* 2006).

Tableau 9 : Classification des sols suivant la CE et la teneur totale en sel (Landon, 1991).

Sol (USDA) classe	La désignation	CE_e (mS/cm)	Sel total Contenu (%)	Réaction de culture
0	Sans sel	0-2	<0.15	Les effets de la salinité sont pour la plupart négligeables, sauf pour les plantes les plus sensibles
1	Légèrement salin	4-8	0.15-0.35	Rendement de nombreuses cultures restreint
2	Modérément salin	8-15	0.35-0.65	Seules les cultures tolérantes donnent des résultats satisfaisants
3	Fortement salé	>15	> 0.65	Seules les cultures très tolérantes donnent des résultats satisfaisants

* Sol USDA: Taxonomie développée par le Département d'Agriculture, États-Unis.

L'alcalinisation, est l'élévation du pH du sol sous l'effet de l'accumulation de bases. Pour comprendre ce mécanisme en simplifiant le phénomène, il est utile de rappeler qu'en milieu aride et en cas de drainage limité ou nul, la forte évaporation conduit à concentrer les eaux de surface et du sol. Lorsqu'une eau même faiblement minéralisée se concentre, sa composition

évolue : la teneur en ions augmente. A la limite, une évaporation poussée conduira à des eaux concentrées et donc salées.

Un pH très élevé du sol est souvent signe de salinité. En effet, les différents anions et cations présents dans le milieu (SO_4^{2-} , NO_3^- , CO_3^{2-} , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , etc.), coprécipitent. Le pH du sol va être déterminé par les plus réfractaires à la précipitation. Ce sont ceux qui sont abondants et, en plus, spécialement solubles. Suivant les cas, on obtient toutes sortes de sels différents : chlorures, sulfates, carbonates, nitrates parfois et un pH incroyablement variable entre 3 et 10 (**Hullin, 1983 in Saker *et al.*, 2012**).

2.2. Analyses statistiques

L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode de traitement statistique qui permet le regroupement de données hétérogènes (unités différentes) dans une représentation graphique simple.

L'application de cette méthode d'analyse dans le domaine de l'étude de l'environnement a fait l'objet de nombreux travaux (**Amiard *et al.*, 1991 ; Bengen *et al.*, 1992 ; Halouani *et al.*, 1993 ; Laberge *et al.*, 1994 ; Amrani *et al.*, 2014 ; Chaouki *et al.* 2015 ; Mouissi *et al.*, 2016**).

L'analyse en composantes principales (ACP) est effectuée sur :

- Une matrice des données constituées de 48 prélèvements (8 points X 6 campagnes) au cours desquels les 11 variables physico-chimiques ont été mesurés ;
- Une matrice des données constituées de 8 prélèvements (4 points X 2 campagnes) au cours desquels 12 éléments physico-chimiques ont été mesurés.

Les matrices de corrélations intermédiaires, les coefficients de corrélations entre les variables et les deux axes F1 et F2 et la projection des variables dans l'espace des axes F1 et F2 ont été obtenues avec un Logiciel XL STAT.

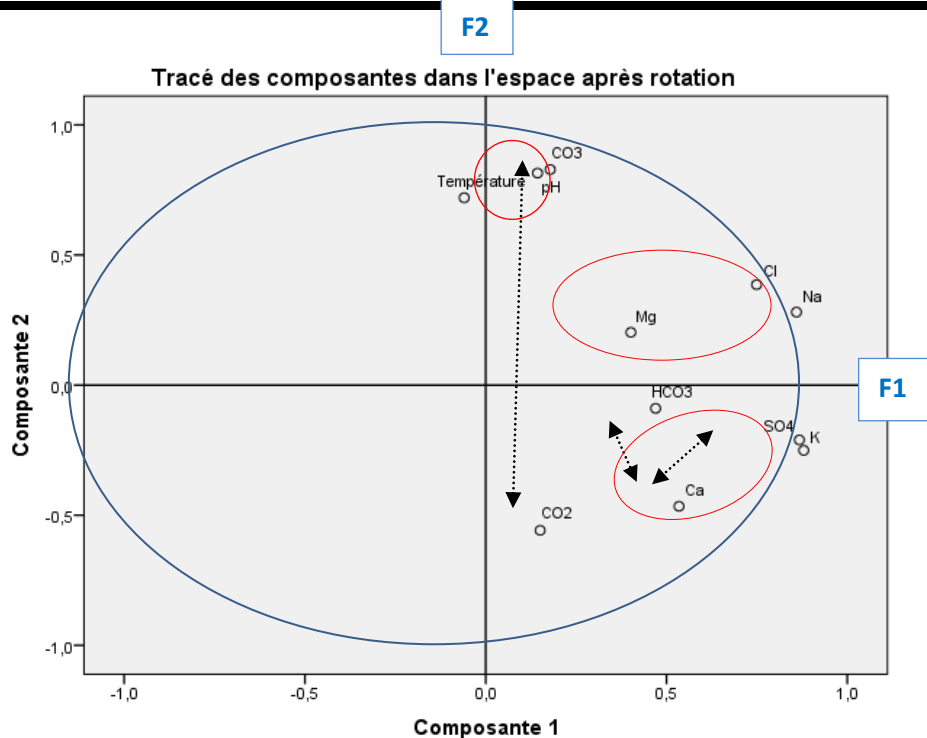


Figure 21: Analyse en composantes principales des paramètres physico-chimiques des saumures des deux *sebkhas*

Tableau 10 : Répartition de l'inertie entre les axes

	F1	F2
Valeurs propres	3.576	2.778
Variabilité (%)	32,506	25,254
% Cumulé	32,506	57,760

L'analyse en composantes principales des saumures des deux *sebkhas* (Figure 21) montre les interdépendances entre les ions majeurs et entre ces derniers et les paramètres physico-chimiques.

Dans le plan factoriel F1xF2, les valeurs propres des deux composantes F1 et F2 et leur contribution à l'inertie totale sont représentées dans le Tableau (10).

Les deux axes pris en considération pour décrire les corrélations entre les variables liées aux structures spatiales, détiennent à eux seuls 57,76 % de l'information totale avec respectivement 32,506 % pour l'axe 1 (axe de minéralisation) et 25,254 % pour l'axe 2.

L'axe 1, est exprimé vers son pôle positif par les carbonates (CO_3^{2-}), la teneur en magnésium (Mg^{2+}), sodium (Na^+), chlorures (Cl^-), sulfates (SO_4^{2-}), potassium (K^+), calcium (Ca^{2+}) bicarbonates (HCO_3^-) et dioxyde de carbone (CO_2), qui présentent de bonnes corrélations entre eux (Figure 21). Alors que l'axe 2 est défini par la température qui s'oppose à la dissolution du CO_2 .

L'examen de matrice de corrélation entre variables, révèle la présence des ensembles, constitués de variables bien corrélées entre elles; il s'agit du :

- Le pH et les carbonates (CO_3^{2-}) ; se regroupent en raison de la dissolution du CO_2 pour donner l'acide carbonique H_2CO_3 , qui, en cédant son H^+ , donne des bicarbonates HCO_3^- , ce dernier cède son H^+ pour se transformer en carbonates CO_3^{2-} (c'est pourquoi cette opposition ($\text{CO}_2\text{-CO}_3^{2-}$), et par voie de conséquence la quantité en proton H^+ exprime le pontiel hydrogène ou le pH du milieu (**Legros, 2009**), ce qui explique la bonne corrélation ($\text{CO}_3\text{-pH}$). Par ailleurs, les bicarbonates (HCO_3^-) inertes sur l'axe F1 indique leurs faibles teneurs dus à leur faible solubilité dans les eaux.
- Les autres éléments majeures en l'occurrence : les chlorures (Cl^-), le sodium (Na^+), le magnésium (Mg^{2+}); le potassium (K^+), les sulfates (SO_4^{2-}), et le calcium (Ca^{2+}), leurs corrélations montrent clairement qu'ils sont issues des sels sodiques et potassiques (NaCl , KCl) et magnésiens (MgCl_2) et des sels sulfatés et en particulier CaSO_4 ; peu solubles à solubles dans les eaux (**Marlet et al., 2006**).

Tableau 11: Matrice de corrélation des paramètres physico-chimiques des saumures des *sebkhas*.

	T	pH	Ca	Mg	Na	K	Cl	SO ₄	CO ₃	HCO ₃	CO ₂
T	1										
pH	0,423	1									
Ca	-0,394	-0,152	1								
Mg	0,167	0,054	0,019	1							
Na	0,147	0,212	0,191	0,415	1						
K	-0,299	0,029	0,722	0,194	0,607	1					
Cl	0,295	0,225	0,121	0,367	0,855	0,474	1				
SO ₄	-0,249	0,015	0,566	0,241	0,617	0,814	0,468	1			
CO ₃	0,395	0,816	-0,215	0,050	0,334	0,010	0,351	0,010	1		
HCO ₃	0,135	0,076	-0,017	0,053	0,341	0,339	0,229	0,396	-0,017	1	
CO ₂	-0,215	-0,481	0,036	-0,058	0,039	0,123	-0,041	0,123	-0,360	0,561	1

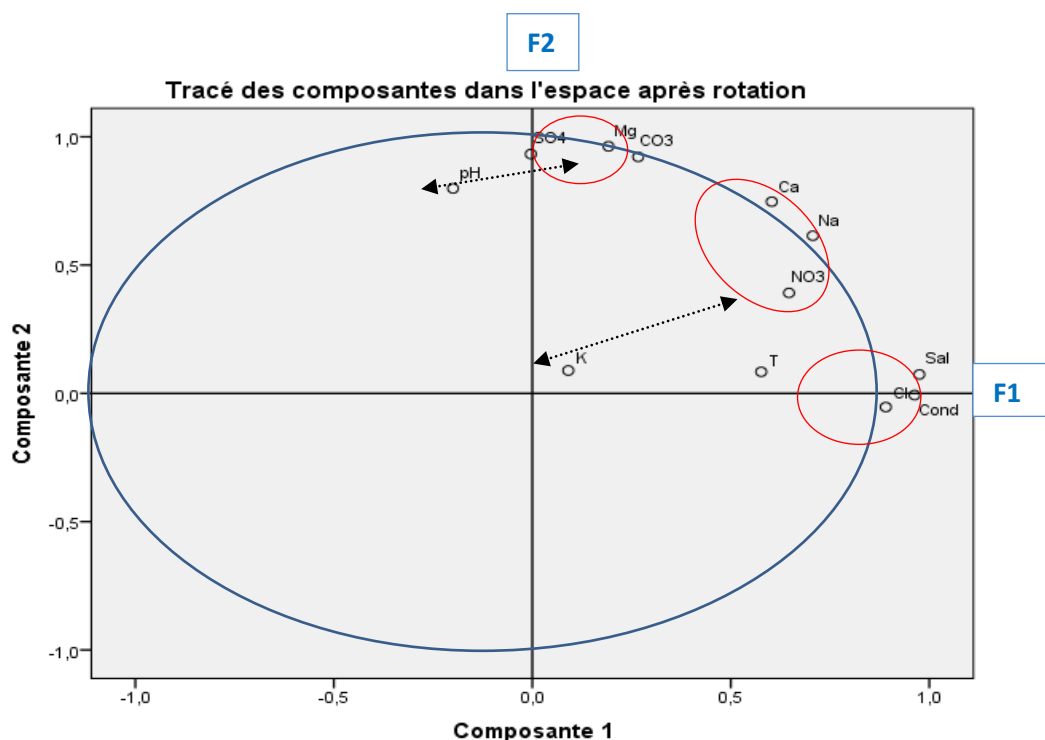


Figure 22: Analyse en composantes principales des paramètres physico-chimiques des sédiments des deux *sebkhas*

Tableau 12 : Répartition de l'inertie entre les axes

	F1	F2
Valeurs propres	5,897	2,938
Variabilité (%)	49,139	24,485
% Cumulé	49,139	73,624

Dans le plan factoriel F1xF2, les valeurs propres des deux composantes F1 et F2 et leur contribution à l'inertie totale sont représentées dans le Tableau (12).

Les deux axes pris en considération pour décrire les corrélations entre les variables liées aux structures spatiales, détiennent à eux seuls 73,72 % de l'information totale avec respectivement 49.139 % pour l'axe 1 et 24.48 % pour l'axe 2 (Figure 22).

L'axe 1, est exprimé vers son pôle positif par les sulfates (SO_4^{2-}), le magnésium (Mg^{2+}), carbonates (CO_3^{2-}), la teneur en calcium (Ca^{2+}), le sodium (Na^+), les nitrates (NO_3^-), le potassium (K^+), les chlorures (Cl^-), qui présentent de bonnes corrélations entre eux. En effet, la salinité du milieu représentée par la conductivité électrique (CE), est due essentiellement aux teneurs élevées des chlorures (Cl^-), du sodium (Na^+), du calcium (Ca^{2+}).

Alors que l'axe 2 est défini par le pH qui s'oppose au pôle des éléments carbonatés représenté par les carbonates (CO_3^{2-}), magnésium (Mg^{2+}) et calcium (Ca^{2+}); bien corrélés, ce qui explique l'alcalinité marquée ($\text{pH} > 8$) des sédiments.

Tableau 13: Matrice de corrélation des paramètres physico-chimiques des sédiments des *sebkhas*

	CE	Salinité	T	pH	Ca	Mg	Na	K	Cl	SO4	NO3	CO3
CE	1											
Salinité	0,984	1										
T	0,475	0,531	1									
Ph	-0,120	-0,141	-0,096	1								
Ca	0,567	0,643	0,586	0,492	1							
Mg	0,149	0,258	0,271	0,635	0,854	1						
Na	0,712	0,752	0,182	0,358	0,798	0,694	1					
K	-0,125	-0,002	-0,049	-0,339	0,089	0,210	0,141	1				
Cl	0,799	0,832	0,283	-0,339	0,415	0,129	0,692	0,435	1			
SO4	-0,064	0,058	0,079	0,546	0,669	0,951	0,579	0,340	0,037	1		
NO3	0,613	0,577	0,452	0,472	0,694	0,416	0,669	-0,133	0,477	0,209	1	
CO3	0,275	0,369	0,150	0,600	0,815	0,954	0,800	0,122	0,225	0,904	0,374	1

Ces résultats (Figure 22) révèlent un abaissement du potentiel d'oxydo-réduction lié à une importante activité microbienne (consommation de tout O_2). Lorsque le milieu tend à devenir anaérobie (c'est le cas des *sebkhas*) certains minéraux sont réduits par certaines bactéries, ils deviennent, sous cette forme beaucoup plus solubles qu'à l'état oxydé. La dissolution des cristaux, toujours impurs, libère simultanément les oligo-éléments qui s'y trouvent (**Davet, 1996**).

Cette répartition des éléments montre la mauvaise diffusion de l'oxygène dans les *Sebkhas* ce qui peut provoquer un potentiel d'oxydo-réduction avec des valeurs négatives (à cause de l'hydromorphie et de la salinité). D'ailleurs cette situation favorise la prolifération des bactéries sulfato-réductrices. De plus l'opposition du pH (Fig 20 et 21) par rapport aux différents éléments dosés est liée à l'hydromorphie qui est peut être suivie d'un assèchement spontané (c'est régulier durant la période chaude). Ceci fait varier les valeurs du pH à cause des accumulations des sulfates.

La précipitation des carbonates (CO_3^{2-} , Mg et Ca) soustrait la concentration des Mg^{2+} et Ca^{2+} , alors que la solubilité des NaCl, et du KCl, augmente la concentration des Na^+ , K^+ et Cl^- , et par conséquent la salinité du milieu (**Legros, 2009**). Par ailleurs, le milieu réducteur peut

affecter les sulfates SO_4^{2-} , par les bactéries sulfato-réductrices, tout en limitant leurs concentrations dans les sédiments, mais aussi par la précipitation des sulfates de calcium (CaSO_4) (Nezli, 2004), et c'est ce qu'explique leur position (inertes) sur le cercle d'ACP sur l'axe F2. La situation du potassium (K^+) au centre des axes, en présence des nitrates (NO_3^-), peut renseigner sur un apport organique (NPK).

3. Caractérisation microbiologique des isolats

3.1. Propriétés microbiologiques

3.1.1. Croissance et propriétés cellulaires

La mise en culture sur milieux pour halophiles a donné trois types de colonies pigmentées. Des cultures pures de colonies rouges à bordures régulières isolées des sédiments d'Oum Eraneb et Ain El Beida (isolat 1). Les cellules sont mobiles et Gram négatif. L'observation microscopique a révélé des cellules en forme de tige et en forme de bacille (Figure 23a).

L'ensemencement à partir des saumures récoltées des deux sites a laissé apparaître des colonies orange en culture pure (isolat 11). Les cellules sont Gram négatif et immobiles. L'observation microscopique laisse apparaître des bacilles, un pléomorphisme sous la forme d'une tige et de triangle s'observe également (Figure 23b).

Des colonies beiges rondes opaques sont inscrites au tableau des isolements (**S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 et S9**), à partir des échantillons d'eaux et de sédiments des deux *sebkhas* (isolats 3). Observés sous microscope, de longs bacilles apparaissent à Gram positif mobiles (Figure 23c). L'annexe 5, rapporte l'aspect macroscopique et microscopique de l'ensemble des isolats.

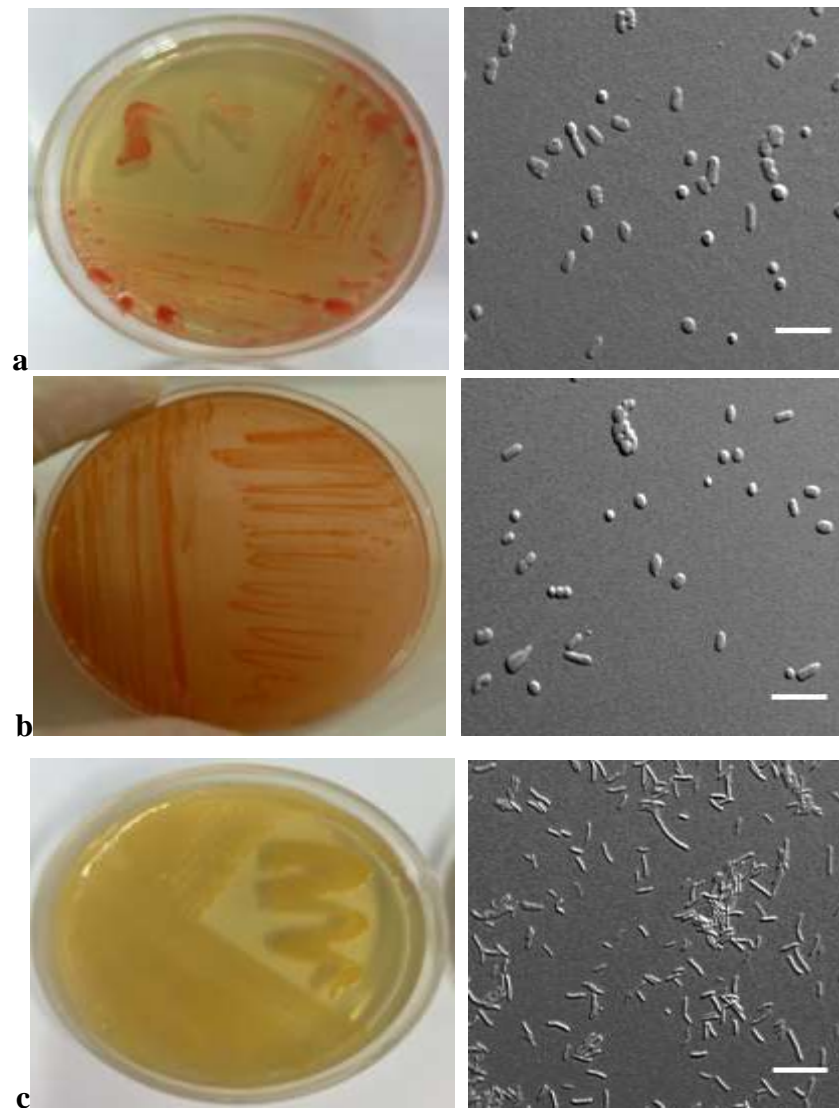


Figure 23 : Aspects macroscopiques et microscopiques pleiomorphes des isolats (images DIC) *Halorubrum litoreum*, (a) *Natronorubrum bangense* (b) et *Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5 (c). Barre d'échelle 10µm (LOB).

La croissance aérobie a été observée entre 20 et 45°C, pour les souches rouges et oranges (Températures plus élevées non-testées) avec abondance des colonies rouges sur milieu à 40°C et à 45°C pour la souche orange (Annexe 6).

Une concentration minimale de 10% (p/v) de NaCl requise pour le développement des deux isolats (1 et 11), allant jusqu'à 25% (p/v) NaCl sur milieu pour la souche orange et >30% pour la souche rouge. Un optimum de 20% (3,4M), retenu pour la croissance optimale des deux souches (Annexe 7).

Une large gamme de pH a été testée allant de 5 à 9,5 à 37°C. Un pH optimal de croissance de 7,5 relevé pour l'isolat 1, et 8,5-9 pour l'isolat 11. Les optimums de croissance se rejoignent à 20% NaCl (3.4 M).

Les isolats 3 (beige) laissent apparaître une croissance dans un intervalle de température de 10°C à 45°C, de pH 6 à 9,5 (Annexe 8) et une concentration de sel requise pour la croissance entre < 5- 25% (p/v). Les optimums de croissance se situent entre 10-15% (p/v) pour le NaCl, 9,5 pour le pH et 37°C pour la température.

Les résultats des analyses physicochimiques présentés dans le tableau 8, montrent que les échantillons de saumures et de sédiments contiennent les d'ions essentiels pour soutenir la croissance de microorganismes extrêmement halophiles (**Birbir et Sesal, 2003 ; Madigan et al., 2003**). Les couleurs légèrement rosés des saumures peuvent être corrélés aux nombres de bactéries extrêmes halophiles orange (5.1×10^3 UFC ml⁻¹) isolées à Oum Eraneb et (9×10^3 UFC ml⁻¹) isolées à Ain El Beida. Quant à la souche rouge sa présence s'est révélée dans les sédiments des deux *sebkhas* respectivement (5.2×10^4 UFC g⁻¹ / 7.5×10^4 UFC g⁻¹).

Faisant partie de la microflore des deux sites, les bactéries haloalcaliphiles sont apparues sur milieux de culture avec une densité moyenne de 4.09×10^3 et 5.4×10^3 (UFC ml⁻¹) pour les échantillons de saumures et 5.14×10^4 et 8.71×10^4 (UFC g⁻¹) pour les sédiments récoltés d'Oum Eraneb et Ain El Beida respectivement.

3.1.2. Caractéristiques physiologiques et phénotypiques

L'ensemble des isolats sont catalase et oxydase positives. La réduction des nitrates en nitrites a été observée uniquement pour l'isolat 1, la formation d'indole s'est limitée aux cellules de l'isolat 2. La croissance est stimulée par une large gamme de sucre chez toutes les souches, cependant aucune activité d'Arginine Déshydrogénase, de lysine Décarboxylase ou uréase n'a été observée pour l'ensemble des isolats. L'ortho-Nitro-Phenyl-Galactosidase positive pour l'isolat 1. L'activité lipolytique a été remarquée avec l'isolat 1, l'hydrolyse de la caséine et de la gélatine ont été observés avec les isolats 3 (S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 et S9).

Les tableaux 14-15 et 16 résumant les résultats des différents tests de caractérisation de nos isolats.

Tableau 14 : Caractéristiques qui différencient *Halorubrum litoreum* JCM 13561^T des autres espèces du même genre.

Caractéristiques	JCM 13561 ^T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	+	+	+	+	+	ND	+	-	-	-	+	+	+	ND
Pigmentation	R	O-R	R	R	R	R	R	R	R	R	P	R	RO	R
NaCl intervalle (%) (p /v)	10->29	15-30	10,5-30	12-30	15-25	12->29	13-30	15	15-29	15-29	15-29	10-28	15->29	15->29
NaCl optimale (%) (p /v)	20	24,5	22,8-25	18-20	20	24,5	20-22,8	20	20	20	20-26	15	24,5	24,5
Température Optimale °C	40	37-45	38	40	37-40	37	42	37	35-40	37	37	45-48	37	35-40
pH intervalle	6,0-9,5	5,0-9,0	8,0-10,5	6,0-10	6,0-9,5	7,0-8,5	6,0-8,5	6,0-9,0	6,0-9,0	6,0-10	6,0-8,5	7,0-9,0	6,0-9,0	7-9
pH Optimale	7,5	7,5	9-10	7-7,5	7-7,5	7,4	7,5	7,5	7,5	7,5	7,3	7,5	7,4	8
Catalase	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Nitrate réductase	+	-	+	-	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	+	+	ND	ND	+	-	-	-	-	-	-	-
Caséine	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Gélatine	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	-
Tween 80	+	+	-	-	-	-	-	ND	+	+	-	+	ND	+

Glucose	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Galactose	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
Fructose	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	ND	-
Sucrose	+	-	-	+	+	-	-	ND	+	ND	-	+	-	-
Lactose	+	ND	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	ND	+
Maltose	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
Mannitol	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	ND	-
G+C%	64,9 ^a	64,4	62,1	68,0	61,9	65,5	65,7	69,4	62,1	64,0	69,4	65,9	65,1	64,6

a G+C% : Cui et al.

Souches:1, *Hrr. terrestre* VKM B-1739^T; 2, *Hrr. alkaliphilum* JCM 12358^T; 3, *Hrr.xinjiangense* BD-1^T; 4, *Hrr. ezzemoulense*5.1^T; 5, *Hrr. Choaviator* Halo-G*^T; 6, *Hrr. arcis* AJ201^T; 7, *Hrr. kocurii* BG-1^T; 8, *Hrr. aquaticum* EN-2^T; 9, *Hrr. ejinorensis*; 10, *Hrr. californiens* SFT-213^T; 11, *Hrr. lipolyticum* 9-3^T; 12, *Hrr. safexense* ETD6; 13, *Hrr. halophilum* B8^T.

Caractéristiques des souches tirées de : Cui *et al.* (2007), Ventosa *et al.* (2004), Feng *et al.* (2004 ;2005), Grant & Larsen, (2001), Kharroub *et al.* (2006), Mancinelli *et al.* (2009), Xu *et al.* (2007), Gutiérrez *et al.* (2008 ; 2011), Castillo *et al.*(2007), Presenti *et al.* (2008), Cui *et al.* (2006), Trigui *et al.* (2010) and Yim *et al.* (2014).

+, Positif; -, négatif; ND, Non décrit ; +/-, variable; R, Rouge ; O, orange.

Tableau 15 : Caractéristiques qui différent *Natronorubrum bangense* A33^T des autres espèces du genre *Natronorubrum*.

	A33 ^T	1	2	3	4
Gram	-	-	-	-	-
Mobilité	-	-	+	ND	-
Pigmentation	O-R	R	R	ND	RS
NaCl intervalle (%) (p /v)	10-25	12-30	14-17,5	12-28	14,6-29
NaCl optimale (%) (p /v)	20	20	15-18	18	20
Température optimale (°C)	45	45	45	44-47	37
pH intervalle croissance	7-9,5	8,5-11	6,5-9,5	8-10	8-11
pH optimale	8,5-9	9	8	7,8-9,2	9
Catalase	+	+	-	-	+
Oxydase	+	+	+	+	+
Indole	+	+	+	+	-
Nitrate réductase	-	-	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	+	-
Hydrolyse de :					
Caséine	-	-	-	-	-
Gélatine	-	+	-	-	-
Tween 80	-	-	-	-	+
Utilisation de					
Glucose	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	+	-	-
Fructose	+	+	-	-	+
Sucrose	+	+	+	+	ND
Mannitol	-	-	-	-	-
G+C %	59,9 ^b	60,1	61,2	60,9	62,5

(b) : (Xu et al., 1999)

Souches: 1, *Nrr. tibetense* GA33^T; 2, *Nrr. aibiense* 7-3^T; 3, *Nrr. sulfidifaciens* AD2^T, 4, *Nrr. sediminis* CG-6^T. Caractéristiques des souches tirées de Xu *et al.* (1999) et Gutierrez *et al.* (2010). +, Positif; -, négatif; ND, Non décrit; R, Rouge ; O, orange ; RS, rose.

Tableau 16 : Caractéristiques différentiant *Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5 des autres espèces du même genre.

Caractéristiques	1	2	3	4	5	6	7
Morphologie	Bacille long	Bacille long	Bacille long	Bacille long	Bacille long	Bacille effilé	Bacille effilé
Gram	+	+	+	+	+	+	+
Pigmentation	Crème	Blanche orange	Blanc à transparent	Crème	Blanche	Jaune clair	Crème
Mobilité	+	-	-	+	+	+	+
Position de la spore	T	T	T	ND	ND	T	ND
NaCl intervalle de croissance	0-25	7,5-30	0-18	5-25	5-30	4-26	5-20
NaCl Optimal % (p /v)	10-15	15	7-10	10-15	nd	10	10-12
Température (°C)	45	15-30	15-45	20-50	25-55	10 <60	15-40
Température optimale (°C)	37	35-38	30	30-37	ND	37	30
pH intervalle de croissance	7,0-9,5	7,0-10	7-10	7-10	6,5-9	5,5-9,5	7-9
pH Optimal	9,5	8	9,0	9-9,5		8,5-9	8
Catalase	+	+	+ f	+	ND	+	+
Oxydase	+	+	-	-	-	+	-
Indole	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
Nitrate réductase	-	-	-	-	-	-	+
H ₂ S	-	-			ND	-	ND
Hydrolyse de:							
Caséine	-	-	-	+	-	-	-
Gélatine	+	-	+	+	+	-	-
Tween 80	-	-		-		+	

Utilisation de								
Glucose	+	-	+	-	ND	-		
Galactose	-	-	ND	+	ND	-	-	
Fructose	-	-	ND	-	-	-	-	+
Sucrose	ND		ND		ND	-		ND
Lactose	ND	-	ND		ND	-		+
Maltose	-	-	ND	+	ND	-	-	-
Mannitol	+	-	ND	+	-	-	-	-
Sensibilité à Streptomycine	+		+	+	ND	+		ND
G+C%	48 ,1	38,2	39,5	37,0	39,0	48,1		41,0

Souches: 1,*A. haloalkaliphilus* C-5; 2, *A. almallahensis* SILM8^T (Pérez-Davo *et al.*, 2014); 3,*A. filiformis* DSM 15448^T(Romano *et al.*, 2005; Usami *et al.*, 2007); 4, *A. silvisoli* DSM 18495^T (Usami *et al.*, 2007); 5,*A. halophilus* KCTC 3990^T (Pérez-Davo *et al.*, 2014); 6,*A.flavidus* KCTC 13258^T (Yoon *et al.*, 2010); 7,*A.salilacus* DSM16460^T (Jeon *et al.*, 2005; Usami *et al.*, 2007) et la présente étude. +, Positif; -, négatif; ND, Non décrit, f : faible.

Les produits d'extraction et de purification (Annexes 9) ont été soumis au séquençage. L'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S de l'isolat 1 a montré une similitude de 99% avec le gène de l'ARNr 16S de la souche JCM13561^T *Halorubrum litoreum*.

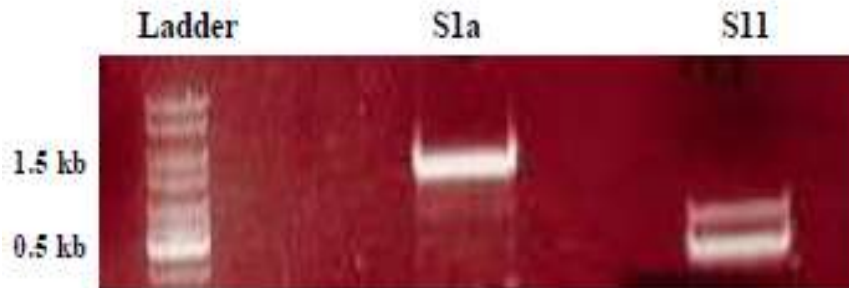


Figure 24: Gel d'extraction des principales bandes après électrophorèse des produits de PCR de l'ADNr 16S des isolats, en utilisant des amorces spécifiques de l'archeae 21F et 1404R.

Concernant l'isolat 2, l'analyse comparative des séquences du gène de l'ARNr 16S a montré qu'il était le plus étroitement apparenté (96%) avec le gène de l'espèce *Natronorubrum bangense* A33^T.

Quant aux isolats (S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 et S9), leurs séquences sont à 95%, proches de celles de la bactérie *Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5.

Le genre *Halorubrum* a été formellement proposé en 1995 par **Mc Genity et Grant**. Le genre *Natronorubrum* a été établi par **Xu et al. (1999)**. Le genre *Alkalibacillus* a été proposé par **Jeon et al. (2005)** basé sur une reclassification de *Bacillus haloalkaliphilus* (Fritze, 1996), (les séquences des isolats sont portées en annexe 10).

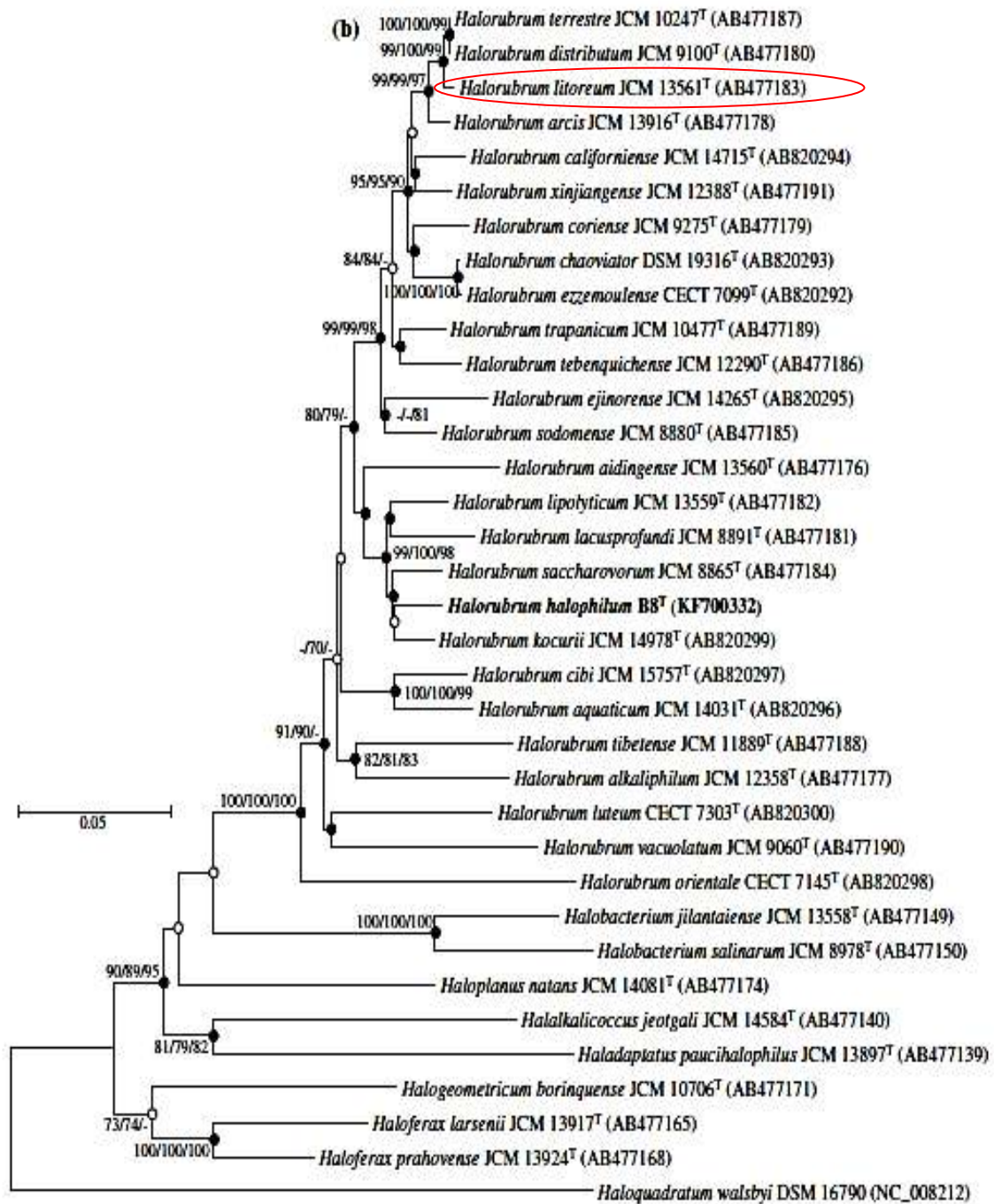


Figure 25: *Halorubrum litoreum* JCM 13561^T relations évolutives des taxons (Yim *et al.*, 2014)

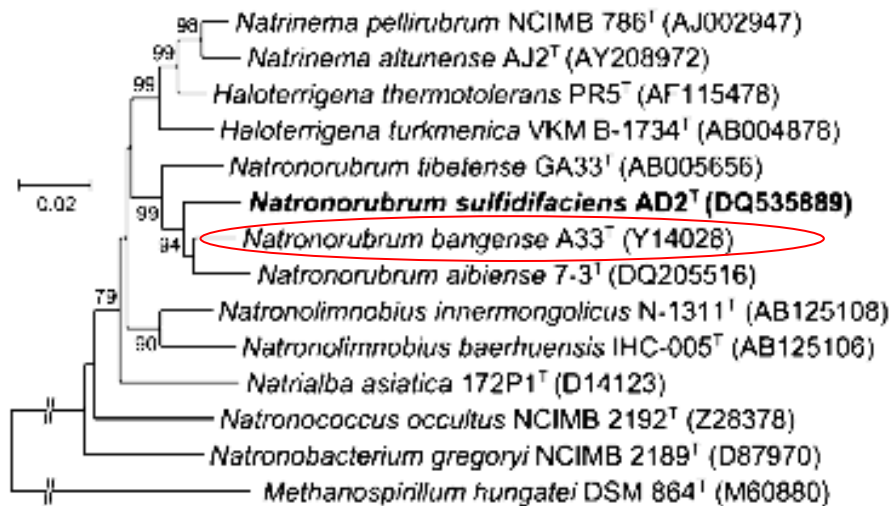


Figure 26: Arbre phylogénétique de l'espèce *Natronorubrum bengense* A33^T (Cui *et al.*, 2007).

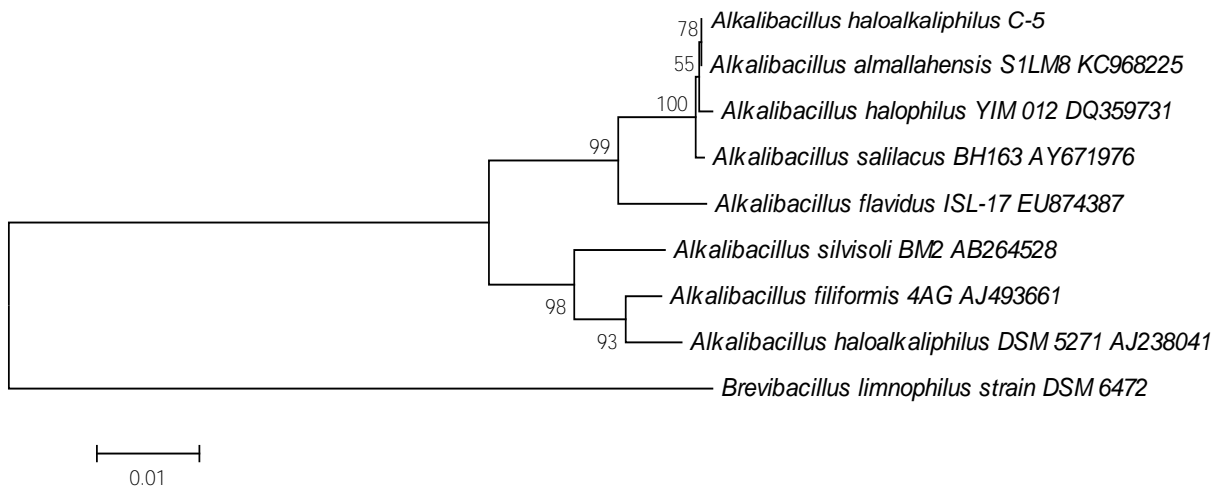


Figure 27: *Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5 (souche 3) relations évolutives des taxons.

L'histoire évolutive a été déduite en utilisant la méthode des jonctions voisines (Saitou *et al.*, 1987). L'arbre optimal avec la somme de la longueur de la branche = 0,17816564 est présenté. Le pourcentage d'arbres de réplication dans lesquels les taxons associés ont été regroupés dans le test d'amorçage (500 réplicats) est indiqué à côté des branches (Felsenstein, 1985). L'arbre est dessiné à l'échelle, avec des longueurs de branches dans les mêmes unités que celles des distances d'évolution utilisées pour déduire l'arbre phylogénétique. Les distances d'évolution ont été calculées à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance composite (Tamura *et al.*, 2004) et sont dans les unités du nombre de substitutions de base par site. L'analyse a impliqué 9 séquences de nucléotides. Les positions de codon incluses étaient 1st + 2nd + 3rd + *Noncoding*. Toutes les positions contenant des lacunes et des données manquantes ont été éliminées. Il y avait un total de 1352 positions dans le jeu de données final. Des analyses évolutives ont été menées dans MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

3.1.3. Résultats de l'antibiogramme

Les résultats de l'antibiogramme ont soulignés la résistance des deux souches extrêmes halophiles à une gamme d'antibiotiques, en outre l'érythromycine et la streptomycine. La souche C-5 s'est révélée insensible envers un bon nombre d'antibiotiques testés, tels que la kanamycine, l'ampicilline, la streptomycine et la gentamycine (Annexe 11).

3.2. Discussion

Les archaea halophiles aérobies se développent dans des environnements avec des concentrations de sel approchant la saturation. Le spectre salin de deux de nos isolats montre qu'elles peuvent croître sur des milieux contenant jusqu'à 30% (p/v) de NaCl avec un optimum de croissance observé à 20% (p/v) de NaCl. Ce profil correspond à celui des espèces d'archaea extrêmes halophiles qualifiées d'halophiles par excellence, dont la plupart croissent de façon optimale au-dessus d'une concentration de 150 gL⁻¹ de sel et lysent à des concentrations inférieures à 100 g L⁻¹ (Castillo *et al.*, 2005 ; Grant *et al.*, 2001; Oren, 2012).

En effet, en diminuant la concentration du NaCl dans le milieu de culture, Oren *et al.* (2002) ont démontré que l'hahlobactérie *Halomicrobium mukohataei* passait d'une forme bacillaire native à une forme sphérique de résistance dans les conditions de croissance qualifiées alors de défavorables. Ces mêmes auteurs ont conclu qu'au-dessous d'une concentration de 15% (p /v) de NaCl, aucune croissance d'*Haloarcula quadrata* n'est observée.

Pareilles conclusions ont été retenues concernant les espèces extrêmes halophiles *Halococcus salifodinae* (Stan-Lotter *et al.*, 1999), *Haloarcula argentinensis* (Ihara *et al.*, 1997) et *Haloferax alexandrinus* (Asker et Ohta, 2002).

En se focalisant sur ce besoin absolu en sel en concentration élevée chez *Halobacterium salinarum*, Panagiotis *et al.* (2007) conclurent que cette halobactérie ne peut se multiplier si la concentration en sel est inférieure à 2,5 mol.l⁻¹ et que le maintien de la structure de sa membrane et le fonctionnement de ses protéines elles-mêmes halophiles en dépend.

Les groupes de bactéries capables de se développer dans des conditions alcalines en présence de sel sont appelés haloalcaliphiles, dotés de mécanismes d'adaptation spéciaux pour survivre et croître sous la salinité et le pH alcalin (**Feng et al., 2005; Joshi et al., 2006**). **Horikoshi (1999)** divise les alcaliphiles en deux groupes physiologiques principaux : les alcaliphiles et les haloalcaliphiles. Si les micro-organismes halophiles ont besoin de NaCl pour la croissance, les alcaliphiles eux, utilisent le Na⁺ pour l'ajustement du pH intracellulaire, le transport de soluté et la rotation des flagelles (**Krulwich et al., 1982**).

L'intervalle de salinité de croissance de la souche alcaliphile isolée s'étend à 25%, avec un optimum marqué entre 10 à 15% (p/v) de NaCl. Un caractère qui selon **Kushner (1978)** lui permet de rejoindre la catégorie des bactéries halotolérantes car elle pousse dans un milieu sans NaCl. Cependant, compte tenu de sa capacité à croître dans un milieu où la concentration en NaCl est supérieure à 20% (p/v), cette souche est plutôt qualifiée de bactérie halotolérante extrême telle que définie par **Tiqula et al. (2006)**.

La bibliographie relate des travaux dont les résultats vont dans le même sens. En effet, **Ntougias et Russell, (2001)** ont isolé des souches haloalcaliphiles à partir des eaux de lavage de production d'olive comestible, tolérant jusqu'à 15% (p/v) de NaCl. Une croissance maximale des isolats était relevée sur milieux à pH 9 dans une gamme de température allant de 4 à 35°C.

Isolée du Lac hypersalin Bakhtegan, situé au sud de l'Iran, la souche AF-2004 s'est développée à des concentrations de NaCl allant de 1 à 17%, avec une croissance optimale à 5% (p/v) de NaCl. Cette même souche a montré une croissance entre 10 et 50°C, dans une large gamme de pH 5-12 (**Amoozegara et al., 2007**)

Les travaux de **Baati et al. (2009)**, au niveau de station de sel de Sfax-Tunisie, ont révélé 40 souches halotolérantes, dont la majorité se développait de manière optimale entre 5-15% de sel, à 37°C et à pH 7.

Les études menées sur le Lac hypersalin Sambhar, en Inde, ont conduit à l'isolement de 93 bactéries haloalcaliphiles qui affichaient une croissance optimale dans des milieux avec 2-25% (p/v) de sel et un pH de 6-12 (**Sahay et al., 2012**).

En 2013, **Khelil et al.**, caractérisaient la souche LMB3981 à partir du Lac El Goléa, Gahrdaia, poussant entre 0 à 25% (p/ v) de NaCl avec un optimum à 7,5% et une croissance sur milieux de pH 6 à 9.

Quant aux isolements sur milieux à différentes concentrations en Mg^{2+} , ils ont laissé apparaître une croissance variable des trois souches. En effet, cet ion est requis à une concentration minimale de 0,6% du milieu pour la croissance de la souche *JCM 13561^T*, mais n'est pas indispensable pour la croissance des deux autres souches qui poussent en absence de Mg^{2+} (Annexe 12). L'exigence variable pour cet ion a été soulevée par **Grant et al. (2001)** ; **Stan-Lotter et al. (2002)** ; **Vreeland et al. (2002)** et chez la plupart des espèces d'haloarchaea.

D'après certains auteurs, l'exigence pour cet ion refléterait la source du microorganisme. La Mer Morte est plus concentrée en ion Mg^{2+} qu'en ion Na^+ de ce fait les espèces isolées de ce biotope exigent une concentration élevée en ion Mg^{2+} mais modérée en ion Na^+ . Alors que celles isolées des lacs hypersalés alcalins, déficitaires en ion Mg^{2+} , croissent en absence ou en présence de faibles concentrations en ion Mg^{2+} (**Ebel et al., 1999** ; **Madern, 2000** et **Kharroub, 2006**).

Les concentrations inférieures à 0,02M en Mg^{2+} permettent l'agrégation des cellules d'*Halobacterium salinarum* (**Kawakami et al., 2007**). D'autres part, l'archaea halophile *Halobaculum gomorense* requière une concentration entre 0,6 à 1,0M de $MgCl_2$ en présence de 2,1M de NaCl (**Oren et al., 1995**) alors qu' *Haloarcula quadrata* perd sa forme carrée ou pléomorphe à des concentrations inférieures à 0,04M en ions Mg^{2+} (**Oren et al., 1999**).

Il s'avère que les cellules d'*Halobacterium salinarum* dépourvues de paroi, sont enveloppées par une pellicule extramembranaire formée uniquement de glycoprotéines reliées par des ions Mg^{2+} qui permet le maintien de leur forme bacillaire (**Panagiotis et al., 2007**).

Les alcaliphiles peuvent également être divisés en psychoalcaliphiles, mésoalcaliphiles, thermoalcaliphiles, et méthanogènes haloalcaliphiliques (**Grant et Tindall, 1986** ; **Jones et al., 1994**).

La gamme de température examinée s'étale de 5 à 50°C pour la souche *Alkalibacillus*, qui a montré une tolérance aux variations entre 10 et <50°C, avec un optimum de croissance à 37°C, elle est de ce fait mésophile.

Cette température optimale de croissance semble s'accorder avec les résultats des études menées au Lac Magadi (Kenya). Effectivement, **Duckworth *et al.* (2000)** ont isolé une *Halomonas magadii*, qui croît entre 25 et 40°C avec une température optimale de 37°C. **Bolyanskaya *et al.* (2004)** ont également décrit une bactérie *Halomonas campisalis* provenant d'un lac alcalin aux États-Unis capable de croître dans une large plage de température entre 10°C et 55°C exhibant un optimum entre 36 à 40°C.

De même, la bactérie *Bacillus halodurans*, isolée par **Abdelnasser *et al.* (2007)** du lac Wadi el-Natrun, en Egypte, produisant une protéase alcaline, a été observée à des températures de 25°C à 55°C.

L'optima de températures pour les souches extrêmes halophiles isolées, s'étend vers 40°C à 50°C, les classant ainsi dans la gamme des thermotolérants, qui regroupe la majorité des représentants de la famille des *Halobacteriaceae* (**Grant *et al.*, 2001 ; Castillo *et al.*, 2005 ; Itoh *et al.*, 2005**).

Étant donné que de nombreuses haloarchaea ont été isolées à partir de lacs salés naturels où elles sont exposées à des températures élevées, il n'est pas surprenant que les taux de croissance maximaux de la plupart des espèces se situent entre 49 et 58°C.

Même l'isolat antarctique, *Halorubrum lacusprofundi*, pousse de manière optimale à environ 30°C. Fait intéressant, la température de survie maximale pour *Haloferax volcanii*, est assez haute, autour de 60°C.

En dehors de la salinité et de la composition ionique, le pH est important pour déterminer la composition de toute population microbienne dans une saumure hypersaline.

L'intervalle de pH permettant la croissance de nos isolats varie de 6 à 9,5 avec un optimum permettant de les classer en neutrophile (pH 7,5) et alcaliphiles (pH 9 et 9,5).

Ces pH tendent plus vers les valeurs légèrement alcalines des pH des saumures et sédiments des *sebkhas*, sujets d'étude.

Ce résultat confirme ceux de Minegishi *et al.* (2010), qui soulignent que "la plupart des représentants des Archaea halophiles aérobies sont neutrophiles, beaucoup sont alcaliphiles, avec une espèce modérément acidophile, *Halarchaeum acidiphilum* dont le pH de croissance ne dépasse pas 6,0.

Selon **Kiss Pappo et Oren (2000)**, les membres de la famille des *Halobacteriaceae*, présentant une température optimale de croissance entre 40 et 45°C, sont subdivisés en deux classes :

- Les Haloneutrophiles : ont un pH de croissance allant de 5 à 8, regroupant les genres : *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halococcus*, *Halorubrum*, *Haloterrigena*, *Natrinema* et *Halogeometricum*.
- Les Haloalcaliphiles : ont un pH de croissance basique entre 8,5 et 11,5 regroupant les genres : *Natronococcus*, *Natrialba*, *Natronobacterium*, *Halobacterium* et *Natromonas*.

La souche haloalcaliphile isolée, pousse sur un milieu à pH 6, avec un optimum de croissance observé à 9,5. On peut raisonnablement avancer que ce n'est pas la limite de son intervalle de pH.

Le terme alcaliphiles (alcali de l'arabe, carbonate de sodium, phile, aimant). Les alcaliphiles sont définis comme des organismes qui poussent de manière optimale à pH supérieure à 8, certains pouvant même croître à un pH supérieur à 11 (**Horikoshi, 1999a ; Grant 2000**). Le taux de croissance optimal de ces micro-organismes est observé dans au moins deux unités de pH au-dessus de la neutralité. Les organismes capables de croître à des valeurs de pH supérieures à 9 ou 10, mais avec des taux de croissance optimaux autour de la neutralité ou moins, sont appelés alcalitolérants (**Kroll *et al.*, 1991 ; Jones *et al.*, 1994**).

Certaines des plages de pH documentées sur lesquelles les haloalcaliphiles et les alcaliphiles poussent comprennent : 9,0 à 10 (**Horikoshi, 1999**), 10-10,5 (**Grant *et al.*, 1999**), 7,0 -11,0 (**Duckworth *et al.*, 2000**) et 8 à 11,0 (**Abdelnasser *et al.*, 2007**).

Et la liste s'allonge, **Zhiyu et al. (2002)** isolèrent *Bacillus okuhidensis* à partir d'une zone thermale d'Okuhida au Japon, dont le pH de croissance s'étend de 6 à 11, l'optimum étant à pH 10,5 en présence de 10% de NaCl (p/v).

En 2012, **Li et al.** décrivaient une bactérie alcaliphile *Halobacillus* sp. LY5, isolée d'un sol salin au Japon, cultivée sur une large gamme de concentrations en sel (0,5 à 15%) avec une croissance optimale observée à pH 10, entre 37- 42°C et à 12% (p/v) de NaCl.

Selama et al. (2014), rapportaient treize bactéries haloalcalitolerantes et haloalcaliphiles isolées des sols du Sahara Algérien. Toutes les souches à l'exception d'une présentaient une gamme de pH de croissance entre 5 et 12 indiquant un caractère alcaliphile, et une souche alcalitolerante avec un pH entre 5 et 9. *Bacillus clausii*, bactérie haloalcaliphile, isolée d'un sol salin en Iran, se développant à pH neutre mais lorsque l'acidité du milieu s'élève à 9, la croissance est optimale accompagnée de grandes quantités de protéase alcaline produites. (**Torbaghan et al., 2016**).

Autant de résultats qui viennent une fois encore étayer les valeurs de pH observées avec nos isolats, montrant que l'alcalinité favorise la croissance des haloalcaliphiles et des alcaliphiles.

Les halobactéries aérobies mènent généralement un style de vie hétérotrophique. Cependant, en dépit de leur exigence commune en sel à des concentrations élevées pour la croissance, leurs demandes nutritionnelles et leurs voies métaboliques sont très différentes (**Adrian et al., 2012**).

Les bactéries haloalcaliphiles sont en majorité peu tentées par le glucose (Tableau 16). En revanche, ce monosaccharide est le plus assimilé par les souches d'Archaea isolées (**Mormile et al., 2003 ; Oren & Mana, 2003 ; Grüber et al., 2004 ; Litchfield et al., 2006**).

Bien que la plupart des Archaea halophiles utilisent préférentiellement des acides aminés comme source de carbone et d'énergie, il existe des espèces utilisant des hydrates de carbone telles que *Haloarcula marismortui*, *Halococcus saccharolyticus* et *Haloferax mediterranei*. Ces espèces ont la capacité de métaboliser les pentoses (arabinose, xylulose), les hexoses (glucose, fructose), le saccharose et le lactose (**Rawal et al., 1988, Altekar et Rangaswamy, 1992, Johnsen et al., 2001**).

Des études sur les voies de dégradation du glucose et du fructose chez *Halococcus saccharolyticus* ont montré que le glucose est entièrement dégradé via une voie de type Entner-Doudoroff (ED), alors que le fructose est presque complètement dégradé (96%) via la voie d'Embden-Meyerhof (**Johnsen et al. 2001**).

D'après **Oren et al. (2002b)**, les halobactéries ne poussent pas sur les sucres, mais leur croissance est stimulée par l'ajout de glucides dans le milieu.

Quant à la mobilité, elle s'est par contre révélée positive pour deux souches. Selon **Leclerc et al. (1984)**, les halophiles possèdent un système de mobilité constitué d'un ou plusieurs flagelles.

La capacité à produire de l'indole est un caractère fréquent chez les halobactéries (**Grant et al., 2001 ; Fan et al., 2004 ; Castillo et al., 2005**). Seule l'espèce isolée appartenant au genre *Natronorubrum* affiche cette capacité.

L'oxygène a une faible solubilité dans les saumures saturées de sel, en particulier à température élevée et par conséquent il peut facilement devenir un facteur limitant pour le développement des Archaea halophiles. Certains produisent des vésicules gazeuses qui leur permettent d'atteindre l'interface eau-air, tandis que d'autres ont la capacité de se développer de façon anaérobie (**Hou et al., 2000**).

Les variantes de croissance anaérobie étudiés chez les *Halobacteriaceae* comprennent l'utilisation d'autres accepteurs d'électrons tels que le nitrate, le diméthylsulfoxyde, le N-oxyde ou le fumarate de triméthylamine ou la fermentation de l'arginine (**Oren, 2006**).

Parmi les espèces archaea halophiles : *Haloarcula marismortui*, *Haloarcula vallismortis*, *Haloferax mediterranei* peuvent se développer de manière anaérobie lorsque le nitrate est présent comme accepteur d'électrons, formant de l'azote gazeux et/ou de l'oxyde nitreux (**Mancinelli & Hochstein, 1986**). Compte tenu des faibles concentrations de nitrate généralement rencontrées dans les saumures hypersalines et de l'absence apparente de régénération du nitrate par nitrification à des concentrations élevées de sel, on peut s'attendre à ce que le processus ne se produise que dans une mesure limitée (**Oren, 1994**). Plusieurs espèces halobactériennes rapportées dans les tableaux (14 et 15) ont recours à cette voie, cependant sur les trois isolats, seule l'espèce *Halorubrum litoreum* en est dotée.

En passant en revue certains résultats d'études, comme souligné par **Fazouane et al.** (2008), la majorité des membres de la famille des *Halobacteriaceae* : *Halococcus salifodinae* (**Stan-Lotter et al., 1999**) *Halobaculum gomorrense* (**Oren et al., 1995**) *Halobiforma haloterrestris* (**Heyzayen et al., 2002**) et *Halorubrum ezzemoulense* (**Kharoub et al., 2006**), sont des bactéries aérobies qui possèdent une nitrate réductase, catalase et oxydase positive, β -galactosidase négative et ne produisent pas d'indole à partir du tryptophane.

Haloarcula quadrata (**Oren et al., 1999**) et *Halomicrobium mukohataei* (**Oren et al., 2002**), présentent une nitrate réductase positive jusqu'au stade gazeux, catalase et oxydase positive et produit l'indole à partir du tryptophane. D'autre part, *Haloferax alexandrinus* (**Asker et Ohta, 2002**), présente une β -galactosidase, catalase et oxydase positive mais uréase, lysine décarboxylase et ornithine décarboxylase négative.

De nombreux représentants des *Halobacteriaceae* produisent des exoenzymes pour dégrader des polymères organiques de manière extracellulaire, rendant de petites molécules organiques disponibles comme source de carbone et d'énergie (**Johnsen et al. 2001**).

Des protéases extracellulaires produites par *Halobacterium halobium*, étaient utilisées comme catalyseur pour générer des peptides à partir des protéines (**Margesin et Schinner, 2001**).

Les activités des enzymes hydrolytiques des Archaea halophiles, en particulier les protéases, sont bien connues pour nuire à la conservation des aliments salés et des peaux (**Kallenberger, 1984; Bailey et Birbir 1993, 1996 ; Birbir et Ilgaz 1996; Elevi et al., 2004; Birbir et al., 2004**).

Par contre, les lipases qui catalysent l'hydrolyse des triglycérides présentent un intérêt potentiel pour l'industrie des détergents. **Boutaiba et al. (2006)** ont mis en évidence l'activité lipolytique d'une archaebactérie halophile extrême, *Natronococcus sp*, qui hydrolyse l'huile d'olive.

En 2007, les travaux de **Birbir et al.**, sur le Lac hypersalin Tuz et deux principales stations de salaison en Turquie, ont récolté 37 souches d'archaea extrêmes halophiles révélant des activités élevées de protéase, de lipase, de DNase et d'amylase, ainsi qu'une activité cellulosique chez 57% des isolats.

De nombreuses études de caractérisation des bactéries halotolérantes et halophiles ont montré que leurs enzymes sont souvent stables et restent actives à des températures au-dessus de 50°C, sur un large intervalle de pH et aux fortes salinités (jusqu'à 30% p/v) (**Prakash et al., 2009**). L'exemple des protéases isolées et caractérisées à partir de plusieurs bactéries halotolérantes telles que les espèces du genre *Bacillus sp.* (**Setyorini et al., 2006**), présentent une activité optimale en présence de 3% à 25% (p/v) de NaCl, sur un intervalle de pH de 5 à 10 et aux températures comprises entre 40 et 75°C (**Vidyasagar et al., 2009**).

Les halophiles modérés ont eu la belle part des travaux de **Baati et al.**, menés en (2010), au niveau du bassin de saumure à Sfax-Tunisie. La plupart des souches isolées s'avère productrice d'hydrolases. En l'occurrence 60% des isolats produisaient des phosphatases, 15% des protéases, 12,5% des amylases et d'ADNases de manière égale. 20% des isolats manifestaient deux activités hydrolytiques, alors que 5% des souches étaient capables de produire trois activités hydrolytiques.

Ainsi, la communauté microbienne des milieux hypersalins est dominée par des micro-organismes halophiles bien adaptés qui, dans de nombreux cas, sont des polyextrémophiles avec la capacité de croître de manière optimale, non seulement à des concentrations élevées de sel, mais aussi à des valeurs de températures et de pH élevées ou basses (**Bowers et al. 2009a, Mesbah et al. 2012**). Selon les caractéristiques présentées dans les tableaux de résultats, nos souches ont effectivement plus d'un atout pour s'épanouir dans de tels environnements. Certains halophiles extrêmes sont capables de croître de manière optimale sous une combinaison de conditions extrêmes. *Natronorubrum bangense*, s'élève à ce rang et apparaît avec une certaine poly-extremophilie.

Deux types d'environnements peuvent avoir le sel comme facteur agissant sur les populations microbiennes ; le sol et l'eau. L'équilibre de sel dans ces environnements est affecté par la pénurie de la pluie et la forte évaporation en particulier dans les régions semi-arides et arides (**Hachicha, 2007**). Les *chotts* sont qualifiés de véritables machines évaporatrices, l'effet température, évaporation concentration de sels, laisse effectivement une empreinte apparente sur l'évolution saisonnière des flores isolées aux niveaux des deux *sebkhas* (Figures 28-29), qui note une hausse progressive de la population atteignant les taux les plus élevés au mois de juin.

Les espèces extrêmes halophiles sont les plus répondues exceptées au niveau des sédiments du site 2, où les bactéries haloalcaliphiles priment. Il n'est pas insolite que les lacs salés naturels ou les marais salants contiennent jusqu'à 10^7 - 10^8 UFC par ml d'Archaea halophiles (Oren 1994 ; Grant *et al.*, 2001). Ils sont facilement détectés dans ces habitats, car ils produisent une pigmentation rouge à orange. Ces pigments sont généralement les caroténoïdes telle la bactériorubérine. L'importance de cette rougeur dans la promotion de la précipitation rapide du sel de mer a été documentée. On sait maintenant que les pigments caroténoïdes des halobactéries piègent le rayonnement solaire, augmentant la température ambiante et les taux d'évaporation dans les salines solaires (Aissaoui *et al.*, 2013).

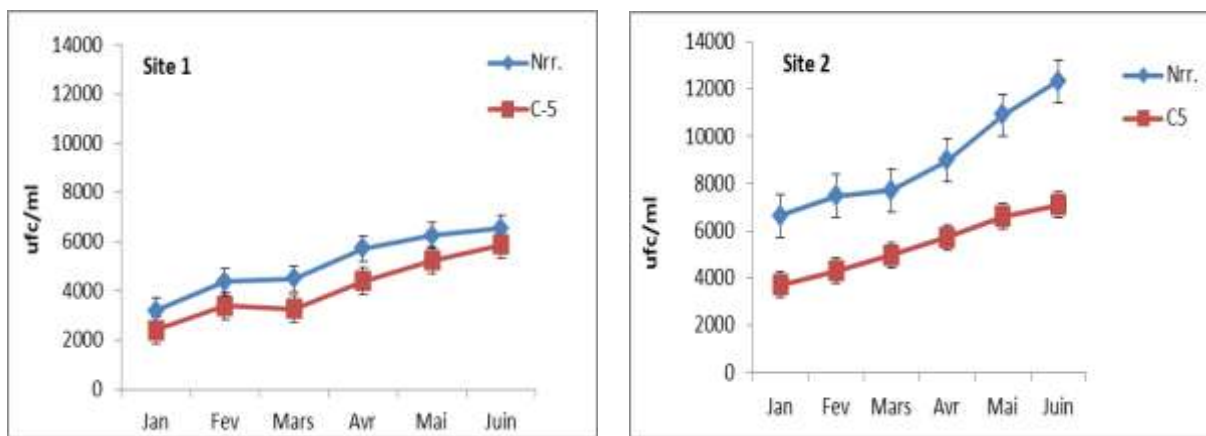


Figure 28: Répartition mensuelle de la flore halophile isolée des saumures des deux sebkhas.

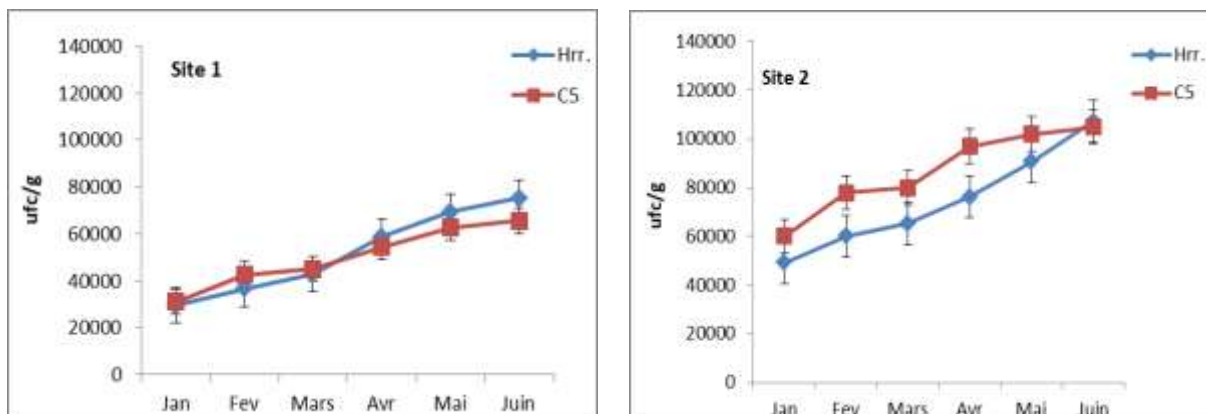


Figure 29: Répartition mensuelle de la flore halophile isolée des sédiments des deux sebkhas.

Hrr. : *Halorubrum litoreum*; Nrr : *Natronorubrum bangense*; C-5 : *Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5.

La répartition spatiale de la flore halophile isolée des saumures des deux sites, représentée par *Nrr. bangense* et *A. haloalkaliphilus* C-5 diffère d'un point à l'autre. On relève aux niveaux des points d'échantillonnage (OR3 et OR4), (Figure 30) l'accroissement des taux de Na⁺ et Cl⁻. A ce niveau la dominance d'une flore par rapport à l'autre sera gouvernée par les propriétés physiologiques dont chacune est dotée.

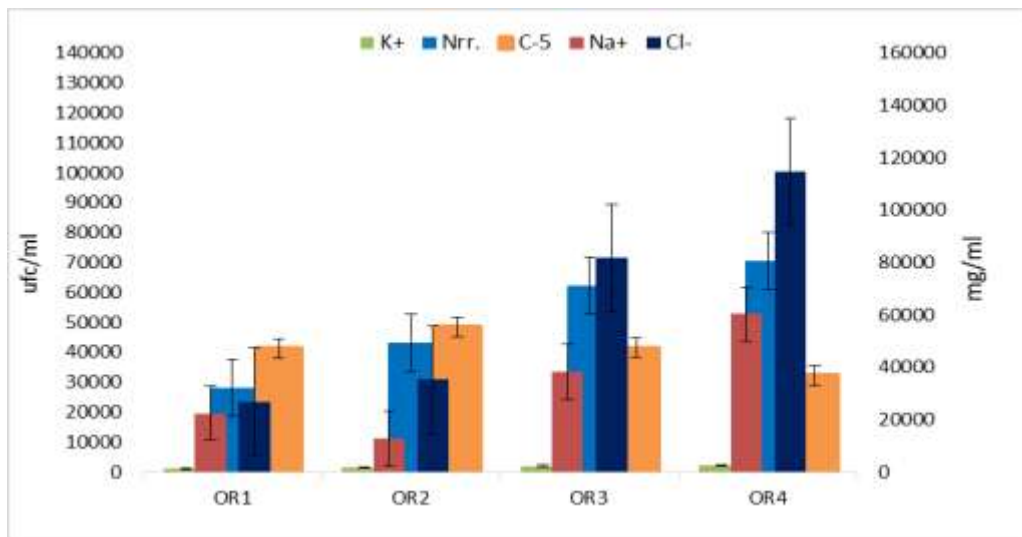


Figure 30: Variation de la flore halophile isolée des saumures de *sebka* Oum Eraneb en fonction de la composition en sel

De même, plus exigeante en sel, la souche extrême halophile *Nrr. bangense*, est en tête de file dans les points retirés de *sebka* Ain El Beida (Figure 31). L'étroite dépendance de cette flore vis-à-vis du NaCl, ne fait que se confirmer. En 2009, la Revue Internationale de Bactériologie 'International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology' avait publié valablement plus de 60 espèces extrêmement halophiles. Parmi ces espèces, 45% des espèces extrêmement halophiles sont publiés avec [Na +] optima égal ou supérieur à 2,0 M, environ 30% ont des optimums [Na +] inférieurs à 2,0 M (équivalent à environ 12% p/v de NaCl), dix-neuf sont publiées à 1,7 M (équivalent à environ 10% p/v NaCl) (**Bowers et al., 2009**).

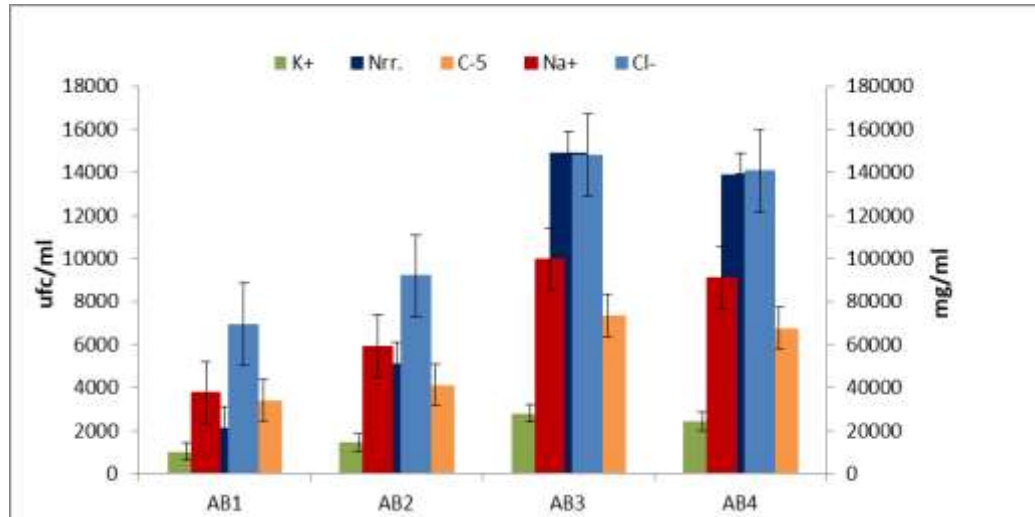


Figure 31: Variation de la flore halophile isolée des saumures de *Chott Ain El Beida* en fonction de la composition en sel

Facteur de croissance influant et pas des moindres, le pH vient également jouer son rôle dans la répartition de la flore haloalcaliphile.

La dominance de bactéries halophiles extrêmes est marquée au niveau des points de prélèvement abondants en NaCl (Figures 32-33). Gardons en mémoire que pour l'extème halophile *Nrr. bangense*, le pH optimal de croissance est à 9, sur un intervalle qui s'étend au-delà, lui permettant ainsi de se propager à des taux appréciables au niveau des deux sites entre des pH de 8,45 à 9. Capables de contrôler jusqu'à un certain point les conditions intracellulaires, le pH intracellulaire des bactéries haloalcaliphiles, sera inférieur à celui du milieu extérieur, de ce fait ces bactéries se répondent sur le site et prennent le dessus quand le taux de salinité se trouve dans leur spectre salin, et que le pH tend vers leurs optimums de croissance qui est à 9.5.

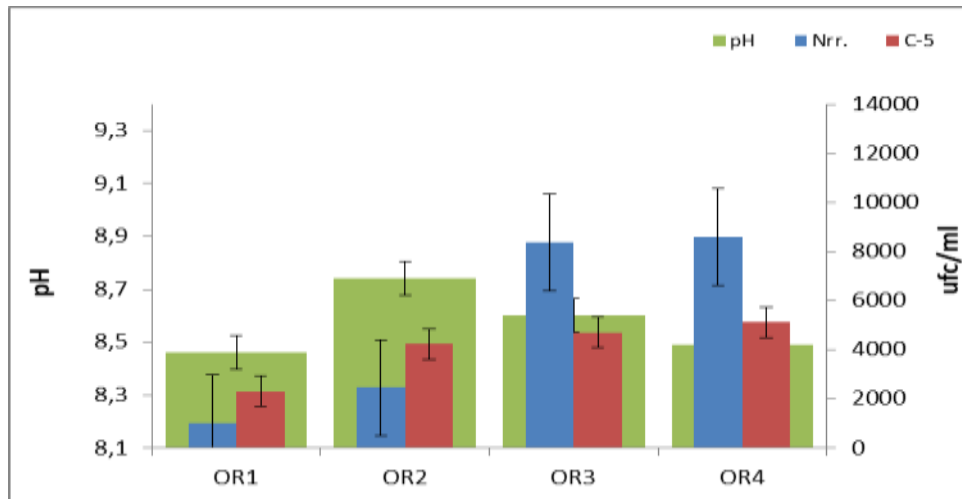


Figure 32: Influence du pH sur la répartition de la flore halophile isolée des saumures- Site 1 : Oum Eraneb

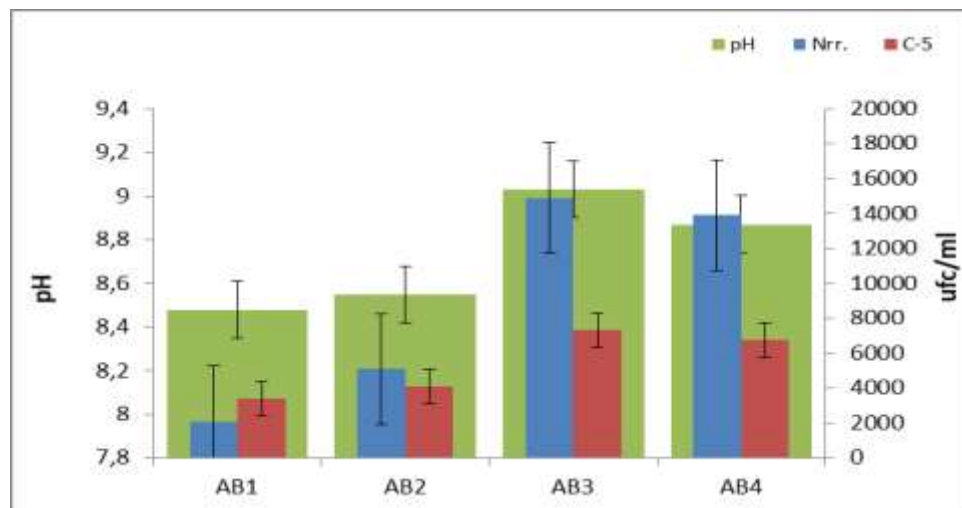


Figure 33: Influence du pH sur la répartition de la flore halophile isolée des saumures- site 2 : Ain El Beida

On note que la densité microbienne dans les échantillons de sédiments est nettement plus abondante de celle des échantillons d'eau. Les figures (34-35) reprennent cette répartition au niveau des deux *sebkhas* creusée par l'écart de salinité d'un point à l'autre.

Cette différence peut être corrélée avec les caractéristiques géochimiques des sédiments, en outre, la biodisponibilité de la matière organique et d'autres facteurs physico-chimiques qui pourraient avoir un fort impact sur la communauté microbienne (Birbir *et al.*, 2004).

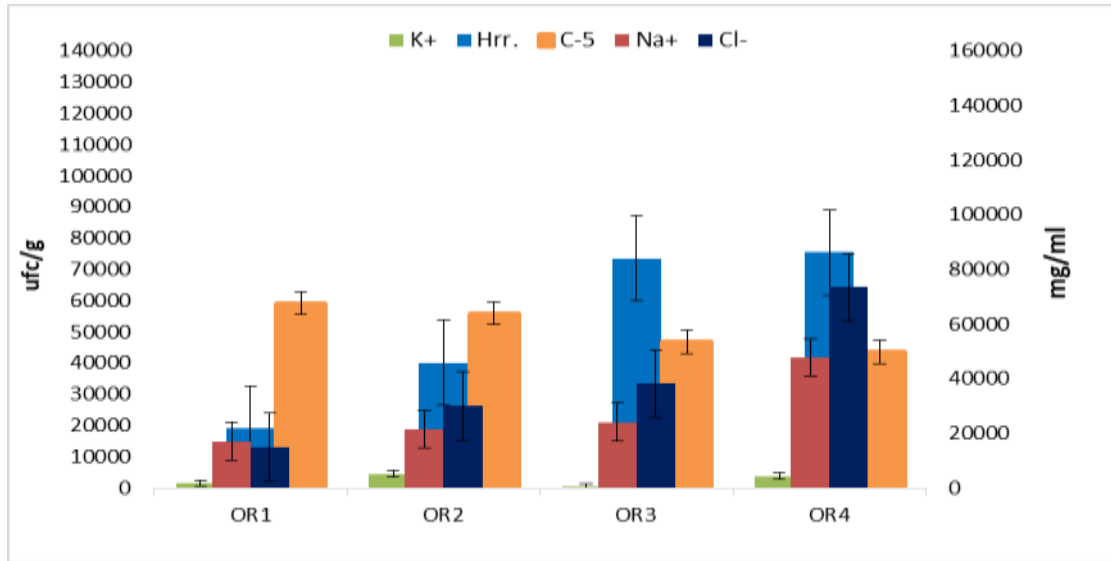


Figure 34: Répartition de la flore halophile isolée des sédiments-*Sebkhia* Oum Eraneb.

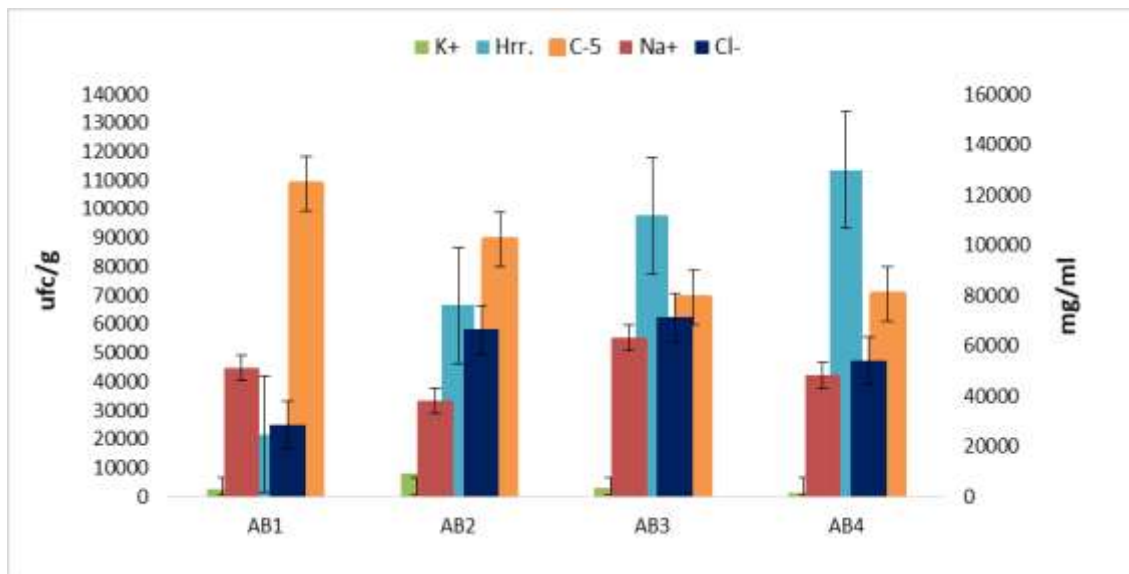


Figure 35: Répartition de la flore halophile isolée des sédiments- *Chott* Ain El Beida

L'abondance dans ces milieux des bactéries Gram-négatif par rapport aux Gram-positif pourrait être expliquée par la différence dans la composition de la paroi cellulaire qui protège la membrane cellulaire par sa rigidité osmotique, des ruptures mécaniques (Block, 2001).

Selon Wiegel, (1999) la famille des *Halomonadaceae* constitue probablement le groupe Gram négatif le plus important dans les environnements salés, alors que la majorité des Gram positifs sont associés au spectre plus varié de *Bacillus*.

Cette dominance des bactéries Gram négatif a été relatée par certains travaux. En effet, les *Halomonadaceae* représentaient la majorité (52.5%) des isolats récoltés de la station de Sfax en Tunisie, regroupant trois genres : *Halomonas* (35%), *Cobetia* (12,5%) et *Chromohalobacter* (5%) (**Baati et al., 2010**).

Le bilan des analyses taxonomiques des bactéries modérément halophiles provenant d'habitats hypersalins en Égypte, a montré que les bactéries Gram négatif représentaient 84,5% des isolats ; affiliés à cinq genres : *Pseudoalteromonas*, *Flavobacterium*, *Chromohalobacter*, *Halomonas* et *Salegentibacter*. Les bactéries Gram positif représentaient uniquement 15.5% du total, réparties entre les genres *Halobacillus*, *Salinicoccus*, *Staphylococcus* et *Tetragenococcus* (**Ghozlan et Deif, 2006**).

Une étude menée en Corée, a indiqué que la collection d'isolats récoltés à partir des étangs de de saumures était dominée par des bactéries Gram négatif (70,3% du total) affiliées aux familles : *Vibrionaceae* (37,5%), *Pseudoalteromonadaceae* (10,9%), *Halomonadaceae* (7,8%), *Alteromonadaceae* (7,8%) et *Idiomarinaceae* (6,3%). Les bactéries Gram positif quant à elles inscrivait 29,7% du total (**Yeon, 2005**).

Certains travaux ont mis l'accent sur la diversité microbienne des lacs salés algériens, parmi lesquels, les études moléculaires de **Boutaiba et al. (2011)**, qui ont révélé la présence de *Haloferax*, *Halorubrum*, *Halalkalicoccus*, *Haladaptatus*, *Halobacterium* et *Halosarcina*, dans deux sebkhas algériennes.

Quelques années plus tard, **Imadalou-Idres et al. (2013)** ont signalé la présence de vingt-quatre souches d'archaea halophiles cultivables isolées de trois environnements algériens (les étangs de salaison à Ichekaben, Bejaia et *sebkhas* à Ouargla et Oran) appartenant à trois genres de la famille *Halobacteriaceae* : *Haloarcula* isolé de tous les sites, tandis que *Halorubrum* et *Natrinema* ont été trouvés à Ouargla et Ichekaben uniquement. Le genre *Halorubrum* domine fréquemment les communautés microbiennes en milieu hypersalin (**Park et al., 2009 ; Shao-Xing Chen, 2013 ; Srivastava et Kowshik, 2013**).

En effet, une étude de la population microbienne qu'abritent des cristaux de sel récupérés du fond d'une station saline, située en zone côtière tunisienne, par le biais d'analyses phylogénétiques de l'ARNr 16S, a dévoilé une communauté archéenne (**Baati et al., 2010**). Identifiée, cette communauté était comparable à celle des étangs salins et des lacs salés précédemment étudiés dans diverses parties du monde (**Anton et al., 2000 ; Benloch et al., 2001 ; Ochsenreiter et al., 2002 ; Rossello-Mora et al., 2003 ; Bolhuis et al., 2004 ; Pasic et al., 2005 ; Fendrihan et al., 2006 ; Maturrano et al., 2006 ; Bardavid et al., 2008**).

La dominance était à l'archaea carré *Haloquadratum walsbyi*, isolé par **Bolhuis et al. (2004) et Burns et al. (2004, 2007)** à partir des salaisons espagnoles et australiennes, respectivement. Les autres clones d'archées étaient liés aux genres *Halorubrum*, *Haloarcula* et *Natronococcus*, dont plusieurs représentants ont été à maintes reprises isolés de nombreux écosystèmes salés dans le monde (**Kamekura 1998 ; Burns et al. 2004, 2007**).

Dans les lacs salés algériens, plusieurs espèces d'*Halorubrum* ont été signalées comme le soulignent **Imadalou-Idres et al., (2013)**, il s'agit en outre d'*Halorubrum tebenquichense*, *Halorubrum chaoviator* et *Halorubrum ezzemoulense*, cette dernière espèce présente à la fois dans les lacs du nord du pays et dans les zones sahariennes (**Kharroub et al., 2006**).

Certes identifiée en Chine, notre étude est la première à rapporter la présence de *Halorubrum litoreum*, de *Natronorubrum bangense* ainsi que l'*Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5 dans les dépressions salées du Sahara algérien.

Les résultats des tests d'antibiotiques reflètent la résistance des deux souches extrêmes halophiles aux antibiotiques tels que l'érythromycine, streptomycine, chloramphenicol, ampicilline, ciprofloxacine et néomycine (Figure 36).

Ces résultats sont compatibles à ceux de **Birbir et al. (2004)** qui soulignent la résistance des douze souches d'archaea, récupérées d'une mine de sel en Turkey, à l'amikacine, l'ampicilline, carbenicilline, cefadroxil, chloramphénicol, ciprofloxacine, érythromycine, gentamycine, néomycine, pefloxacine, pénicilline, streptomycine et tétracycline.

Les travaux d'Ozcan *et al.*, (2006) menés sur six environnements hyper salins en Turkey, ont abouti à 33 isolats appartenant à 9 genres de la famille d'*Halobacteriaceae* : *Halorubrum*, *Natrinema*, *Haloarcula*, *Natronococcus*, *Natrialba*, *Haloferax*, *Haloterrigena*, *Halalkalicoccus* et *Halomicrobium*. Ces souches résistaient pratiquement à la même gamme d'antibiotiques.

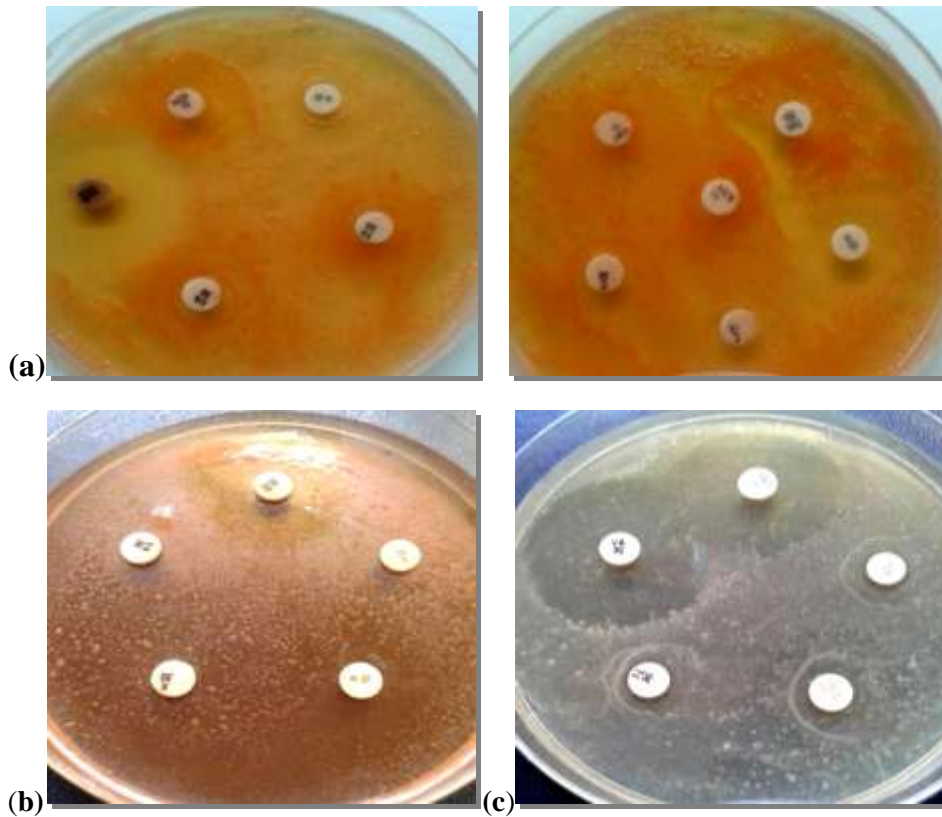


Figure 36: Résultats de l'antibiogramme des souches isolées : *Natronorubrum bengense* (a) ; *Halorubrum litoreum* (b) et *Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5(c).

Les données bibliographiques consolident ces bilans, car les membres des *Halobacteriaceae* sont généralement insensibles à l'érythromycine ou ne sont inhibées que par de très fortes concentrations (Hilpert *et al.*, 1981; Pecher et Bœock, 1981 ; Bonelo *et al.*, 1984 ; Bock et Kandler, 1985). Ces mêmes auteurs déclarent que les Archaea halophiles (*Halobacterium*, *Halococcus*, *Halorubrum*, *Haloferax* spp.) sont résistants au chloramphénicol ou sont inhibées seulement à très forte concentration.

L'absence de la muréine chez les archaea, les rend insensibles à la plupart des antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi cellulaire. Elles ne sont pas affectées par les concentrations élevées de pénicilline, de cyclosérine, de vancomycine et de céphalosporine, tous inhibiteurs de la synthèse de la muréine (**Perry et al., 2004**).

La synthèse des protéines des archaea elle non plus n'est pas affectée par les antibiotiques usuels : chloramphénicol, cycloheximide et streptomycine, sauf la néomycine qui est inhibitrice à de concentrations élevées. La tétracycline est aussi un inhibiteur peu efficace bien qu'elle inhibe la synthèse protéique des bactéries et eucaryotes.

Tortota et al. (2003) Perry et al. (2004), suggèrent que la structure des ribosomes des Archaea est très différente de celle des bactéries et des eucaryotes.

Partant de ce postulat et du principe que le chloramphénicol, l'érythromycine et l'anisomycine étaient utilisés pour différencier les protéines archéennes et bactériennes synthétisées (**Oren, 1990b, 1991 ; Pedros-Ali' et al., 2000 ; Gasol et al., 2004**). **Bardavid et Oren (2008)** ont mesuré l'incorporation d'acides aminés en suspension dans un bassin de saumure par *Haloquadratum walsbyi* ; l'archaea dominant dans ces biotopes isolé par **Burns et al., (2007)**, d'une part et une bactérie extrêmement halophile du genre *Salinibacter* (**Ant'on et al., 2000, 2002**) d'autre part. Ils ont observés que les taux d'incorporation des acides aminés étaient deux fois plus élevés chez la bactérie et conclu que l'érythromycine (20-40 mgmL⁻¹) et l'anisomycine (10-20 mgmL⁻¹) conviennent pour différencier les activités archéennes et bactériennes dans cet écosystème.

Le chloramphénicol inhibe en effet la plupart des bactéries halophiles y compris le *Salinibacter* extrêmement halophile, à des concentrations plus élevées cet antibiotique ralentit l'incorporation des acides aminés par *Haloquadratum*. Le degré d'inhibition de ce dernier dépend de la concentration en sel de la saumure dans laquelle les cellules étaient en suspension.

L'anisomycine, connu comme un inhibiteur de la synthèse des protéines eucaryotes, est un inhibiteur très efficace de la synthèse des protéines chez les Archaea halophiles (**Pecher et Béoock, 1981**).

La souche C-5 s'est montrée insensible envers un grand nombre d'antibiotiques testés, en outre la kanamycine, l'ampicilline, streptomycine, gentamycine et rejoint la majorité des souches alcaliphiles dans sa sensibilité aux bacitracine, navobiocine et pénicilline.

Les antibiotiques sont connus pour être sensibles aux conditions environnementales telles que la température, l'exposition à la lumière et le pH. Effectivement le pH acide peut avoir un effet négatif sur l'efficacité de plusieurs antibiotiques (Falagas *et al.*, 1997). Néanmoins, Très peu d'informations sur la stabilité des antibiotiques dans les milieux alcalins sont disponibles.

Florey (1972), Regna *et al.* (1946) et Loftin *et al.* (2004) affirment que les conditions alcalines ont un impact négatif sur l'efficacité de plusieurs antibiotiques courants, y compris l'ampicilline, la streptomycine et la tétracycline.

Plusieurs articles publiés sur des organismes alcaliphiles isolés, provenant de diverses sources, fournissent des données sur la résistance aux antibiotiques et les susceptibilités de ces organismes. Par exemple, *Anoxybacillus pushchinensis*, est résistante à plusieurs antibiotiques y compris la pénicilline, la vancomycine, l'ampicilline, la streptomycine et le chloramphénicol (Pikuta *et al.*, 2000).

Une autre bactérie, *Chimaericella boritolerans* s'est révélé insensible à la kanamycine, la gentamycine, et la pénicilline. *Chimaericella alkaliphilia* s'est avérée résistante à la kanamycine, la céphalothine et le chloramphénicol (Ahmed *et al.*, 2007).

Alcaligenes latus isolé à partir d'effluents industriels alcalins a marqué sa résistance à la carbénicilline, la furazolidone, la pénicilline et au zinacef (Ali *et al.*, 2009).

L'efficacité des antibiotiques à l'égard des bactéries capables de se développer sur une large gamme de valeurs de pH allant de 7 à 11 a été testée. Les résultats ont montré que la concentration minimale inhibitrice de plusieurs antibiotiques, y compris la tétracycline, variait selon les différentes valeurs du pH.

Plusieurs antibiotiques se sont révélés inefficaces contre *Halomonas eurialkalitolerans* à des pH supérieurs à 8, y compris la tétracycline, l'ampicilline, la kanamycine, la néomycine, la roxithromycine et la streptomycine.

La vancomycine était sans effet à toutes les valeurs de pH testées en raison de sa dégradation connue dans des conditions alcalines. De façon surprenante, l'érythromycine et le sulfaméthizole étaient plus efficaces contre l'halobactérie à pH 11 que dans les milieux neutres. Le changement de la CMI observable dans des conditions alcalines semble indiquer que la résistance aux antibiotiques observée chez ces bactéries est l'effet de l'alcalinité sur les antibiotiques testés et pas nécessairement l'activité des produits du gène de résistance aux antibiotiques.

Conclusion

*« Nul ne peut atteindre l'aube sans passer par l'ombre
de la nuit »*

K. Gibran.

Conclusion

Les procaryotes montrent une extraordinaire capacité d'adaptation aux conditions physicochimiques drastiques régnant dans certains environnements dits "extrêmes" tant en termes de température, de salinité, de pH que de pression hydrostatique. Répandues dans ces niches écologiques extrêmement hostiles, ces micro-organismes vivent en utilisant leur polyvalence adaptative dans différentes situations de stress.

Le Sahara est sujet à de grandes fluctuations de paramètres tels que la température, le pH ou la salinité. Les milieux hypersalins, représentés par les chotts, sebkhas et sols salins, sont un exemple typique d'environnements extrêmes abritant une flore microbienne, qui défie les lois de la biologie et se développe aux limites de la vie. Ces microorganismes constituent un outil performant pour les sciences fondamentales du fait qu'ils représentent le modèle unique de la stabilité des biomolécules aux conditions extrêmes de l'environnement.

Impregné par cette idée, nous avons adopté dans ce travail une approche physico chimique combinée aux méthodes culturales et moléculaires, à la recherche d'halobactéries dans deux dépressions salées non explorées sous cet angle jusque-là : Oum Eraneb et Ain El Beida, situées à Ouargla, dans le désert Algérien.

La physico chimie des saumures et sédiments de ces sites a permis de les comparer à d'autres environnements salins terrestres (athallassohalins) et aquatiques (thalassohalins) du monde, en soulignant leur abondance en sel et leur alcalinité.

En effet, les sites étudiés offrent des conditions inhabituelles d'aridité, de sécheresse du climat avec une abondance en sel (128 et 165g /l), une certaine alcalinité traduite par les pH des saumures qui fluctuent entre 7,47–9,58 et 7,41-9,9 à Oum Eraneb et A.El Beida respectivement.

Un gradient de concentration de salinité croissant de la périphérie vers le centre est remarqué au niveau des dépressions salées. L'élévation de la température au cours de la saison estivale est le principal facteur d'une évaporation intense qui, par conséquent, est à l'origine de l'augmentation des concentrations de sel dans ces saumures. Le faciès chimique des eaux du *chott* d'Ain El Beida et *sebkha* O. Eraneb n'a pas montré de variations notables au cours des campagnes d'échantillonnage étalées sur des mois, il est chloruré sodique potassique.

L'analyse des sédiments dresse un profil semblable et dévoile un pH qui va de 8 à 9 avec un taux de salinité de 1,71% dans le premier site et de 2,26% au niveau du second. Les ions sont représentés par les chlorures, les sulfates. Les cations sont représentés par le sodium et le calcium. De faibles teneurs en potassium sont observées, ce qui, à l'exception de l'abondance des carbonates de calcium, cadre avec les conclusions tirées sur la nature des sols salés.

Quant à l'exploration microbienne de ces écosystèmes aquatiques sahariens, elle s'est avérée intéressante et a révélé la présence de souches halophiles modérés mais également halophiles extrêmes alcali-thermotolérantes. Le spectre salin de deux isolats montre qu'elles peuvent croître sur des milieux contenant jusqu'à 25% et même 30% (p/v) NaCl avec un optimum de croissance observé à 20% (p/v) NaCl, rejoignant le rang des halophiles par excellence

Les résultats du séquençage, certifient l'appartenance de deux isolats au domaine des Archaea, ordre des *Halobacteriales*. Il s'agit des espèces *Halorubrum litoreum* *Natronorubrum bangense*. Ainsi que la souche bactérienne halotolérante extrême *Alkalibacillus haloalkaliphilus C-5*. Certes identifiées, ces espèces n'ont pas été rapportées auparavant dans de tels écosystèmes du désert Algérien.

La présence de cette flore au niveau des deux sites avec une forte représentativité des archaea halophiles extrêmes, est un constat qui rejoint les conclusions de multiples travaux. Retenons que les bactéries extrêmement halophiles représentent environ 25% de la population procaryotes, réparties de manière égale entre des espèces aérobies et anaérobies.

La répartition spatiale de cette flore par site a fait ressortir que les espèces extrêmes halophiles en quête de sel, se concentrent vers les points de prélèvement les plus retirés des *sebkhas* et de ce fait, les plus abondants en sel. Certes, stimulée par les pH alcalins la flore haloalcaliphile est freinée par les taux élevés de salinité au fur et à mesure qu'on s'infiltré au cœur de ces dépressions salées.

La répartition mensuelle des isolats par site, retrace leur abondance en période chaude, favorisée par la hausse des températures et la concentration de sel sous l'effet des taux d'évaporation croissants.

Peu d'information existe à ce jour concernant la diversité des micro-organismes halophiles et halotolérants isolés des sols salins. Ce domaine commence à peine à être exploré et apprécié, car parallèlement à leur diversité, les constituants cellulaires et les biomolécules de ces

halobactéries sont dotées de propriétés structurales, de stabilité et fonctionnelles tout à fait exceptionnelles.

Les enzymes de ces micro-organismes trouvent, d'ores et déjà, des applications en biotechnologie. Grâce aux approches microbiologiques et moléculaires, le biofonctionnement des niches écologiques qu'occupent ces extrémophiles est de mieux en mieux appréhendé, mais il reste encore de grandes inconnues biogéomicrobiologiques, qui n'ont toujours pas été complètement élucidées (biodégradation anaérobie des hydrocarbures par exemple).

Ainsi, l'exploration des environnements extrêmes tels que *sebkhas* Oum Eraneb et Ain El Beida, constitue une entreprise de longue haleine qui n'est que partiellement réalisée.

Il est tentant de penser que ces deux écosystèmes particuliers sont, de par nos résultats, un gisement d'espèces halo-alcaliphiles. La recherche d'intérêt biotechnologique de ces souches ne faisait pas partie des objectifs fixés dans cette étude. Un pas dans cette direction vise d'une part, à se pencher plus sur alcaliphiles au bagage enzymatique à prospector, d'autres parts, à reprendre les isolements en élargissant le champ d'investigation par sebkha et en optimisant les paramètres de culture, en prédilection pour les espèces extremhalophiles en quête de biomolécules ; enzymes, substances antibactériennes, polymères et extremolytes.

« Ce qui est maintenant prouvé ne fut jadis qu'imaginé. »

W. Blake.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

À

- Abdelnasser, S., Nefisa S., EI-Shayeb, M. A., Mabrouk, S. (2007).** Isolation and Identification of Alkaline Protease Producing Alkaliphilic Bacteria from an Egyptian Soda Lake. *Journal of Applied Sciences Research*, 3 (11), 1363-1368.
- Andrei, A.S., Banciu, H.L., Oren, A. (2012).** Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiol Lett*, 330 1–9.
- Ahmed, I, Yokota, A, Fujiwara, T. (2007).** *Chimaereicella boritolerans* sp. nov., a boron-tolerant and alkaliphilic bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 57: 986-92.
- Aino, K., Hirota, K., Matsuno, T., Morita, N., Nodasaka, Y., Fujiwara, T., Matsuyama, H., Yoshimune, K., and Yumoto, I. (2008).** *Bacillus polygoni* sp. nov., a moderately halophilic, non-motile obligate alkaliphile isolated from indigo balls. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 120–124.
- Ali, S.S., Habib, I., and Riaz, T. (2009).** Screening and characterization of alkaliphilic bacteria from industrial effluents. *Punjab Univ. J. Zool*, 24 49-60.
- Albers, S., Vossenber, J., Driessen, A. and Konings, W. (2001).** Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions. *Extremophiles*; 5: 285-294.
- Albuquerque, L., Tiago, I., Taborda, M., Nobre, M. F., Verissimo, A. and Da Costa, M. (2008).** *Bacillus isabeliae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a sea salt evaporation pond. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 226–230.
- Altekar, W. Rangaswamy, V. (1992).** Degradation of endogenous fructose during catabolism of sucrose and mannitol in halophilic archaeobacterium. *Arch Microbiol* 158, 356-363.
- Amend, J.P., Rogers, K.L., Shock, E.L., Gurrieri, S. and Inguaggiato S. (2003).** Energetics of chemolithoautotrophy in the hydrothermal system of Vulcano Island, southern Italy. *Geobiology*; 1: 37-58.
- Amarouche-Yala, S., Benouadah, A., Bentabet, A. E., Lo'pez-Garcia, P. (2014).** Morphological and phylogenetic diversity of thermophilic cyanobacteria in Algerian hot springs. *Extremophiles* DOI 10.1007/s00792-014-0680-7.
- Amarouche-Yala, S., Hacéne, H. (2006).** Etude de la microflore du chott melghir (w. d'El oued) : isolement, identification et évaluation du degré de pollution. Mémoire de magistère en Sciences de la nature. Option Microbiologie de l'environnement. Univ Houari Boumediene.
- Amoozegara, M. A., Azadeh, Z., F, Hamid, R., Karbalaie-Heidarib, Razavi, M. R. (2007).** Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiological Research*, 162 369-377.
- Antunes, A., Taborda, M., Huber, R., Moissl, C., Nobre, M.F. and Dacosta, M.S. (2008).** *Halorhabdus tiamatea* sp. nov., a non-pigmented, extremely halophilic archaeon from a deep-sea, hypersaline anoxic basin of the Red Sea, and emended description of the genus *Halorhabdus*. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 58: 215-220.

Anton, J., Rossello-Mora R., Rodríguez-Valera, F. and Amann, R. (2000). Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(7), 3052–3057.

Anton, J., Oren, A., Benloch, S., Rodríguez-Valera, F., Amann, R., and Rossello-Mora, R. (2002). *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel extreme halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *Int J Syst Evol Microbiol*, **52**, 485–491.

Asker, D., Ohta Y. (2002). *Haloferax alexandrinus* sp. Nov., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt). *Inter. J. Syst. Evolut. Microbio.* **52**, 729-738.

Azahara, Pérez-Davo, Margarita Aguilera, Alberto Ramos-Cormenzana and Monteoliva-Sanchez (2014). *Alkalibacillus almallahensis* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from an inland solar saltern. *Int Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **64**, 2066-2071.

B

Baati, H., Amdouni, R., Gharsallah, N., Sghir, A. and Ammar, E. (2010). Isolation and characterization of Moderately Halophilic Bacteria from Tunisian Solar Saltern. *Curr Microbiol.* **60**, 157-161.

Baati, H., Guermazi, S., Gharsallah, N., Sghir, A. and Ammar, E. (2010). Microbial community of salt crystals processed from Mediterranean seawater based on 16S Rna analysis. *Can. J. Microbiol.* **56**, 44–51.

Baati, H., Guermazi, S., Gharsallah, N., Sghir, A. and Ammar, E. (2010). Novel prokaryotic diversity in sediments of Tunisian multipond solar saltern. *Research in Microbiology Elsevier.* **161** (2010),573-582.

Baliga, N.S., Bonneau, R., Facciotti, M.T., Pan, M., Glusman, G., Deutsch, E.W., Shannon, P., Chiu, Y., Weng, R.S. and Gan, R.R. (2004). Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the Dead Sea. *Genome Research*; **14**, 2221-34.

Bardavid, E.R., Khristo, P. and Oren, A. (2008). Interrelation ships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles*, **12**(1): 5–14.

Baker-Austin, C., Dopson, M. (2007). Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiology*; **15**,165-171.

Bardavid, R.E. et Oren, A. (2008). Sensitivity of *Haloquadratum* and *Salinibacter* to antibiotics and other inhibitors: implication for the assessment of the contribution of Archaea and Bacteria to heterotrophic activities in hypersaline environments. *FEMS Microbiol Ecol*, **63**, 309-315.

Benloch, S., Acinas, S.G., Anton, J., Lopez-Lopez, A., Luz, S.P. and Rodriguez-Valera, F. (2001). Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR. *Microb. Ecol.* **41**(1), 12–19.

Bergmann, S. (2015). Ectoine production by halotolerant microorganisms – Process optimization and characterization of cellular state. Retiré de <http://Cuvillier/de/de:schoppublications/6548>.

- Birbir, M. and Sesal, C. (2003).** Extremely halophilic bacterial communities in Sereflikochisar Salt Lake in Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 27, 7–21.
- Birbir, M., Ogan, A., Calli, B. and Mertoglu, B. (2004).** Enzyme characteristics of extremely halophilic archaeal community in Tuzkoy Salt Mine, Turkey. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 613-621.
- Birbir, M., Calli, B., Mertoglu, B., Bardavid, R.E., Oren, A., Ogmen, M.N. and Ogan. A. (2007).** Extremely halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the adjacent Kaldirim and Kayacik salterns. *World J Microbiol Biotechnol.*, 23,309–316.
- Bock, A. and Kandler, O. (1985).** Antibiotic sensitivity of archaebacteria. *The Bacteria. A Treatise on Structure and Function.* (Woese CR & Wolfe RS, eds) Vol. VIII – Archaebacteria, pp. 525–544. Academic Press, Orlando, FL.
- Bolhuis, H., Poele, E.M. and Rodriguez-Valera, F. (2004).** Isolation and cultivation of Walsby's square archaeon. *Environ. Microbiol.*, 6(12): 1287–1291.
- Block, S.S. (2001).** Desinfection, sterilisation and preservation. Lippincott Williamis and Wilkins (eds), pp. 31–46.
- Boltyanskaya, V., Antipov, A. N. , Kolganova, T. V., Lysenko, A. M., Kostrikina, N. A. and Zhilina, T. N. (2004).** *Halomonas campisalis*, an Obligatorily Alkaliphilic, Nitrous Oxide–Reducing Denitrifier with a Molybdenum Cofactor–Lacking Nitrate Reductase. *Microbiology*, 73, 271–278.
- Bonelo, G., Ventosa, A., Megias, M. & Ruiz-Berraquero, F. (1984).** The sensitivity of halobacteria to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett*, 21, 341-345.
- Boone, D. R., Liu, Y. T., Zhao, Z. J., Balkwill, D. L., Drake, G. R., Stevens, T. O. and Aldrich, H. C. (1995).** *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe (III)-reducing and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *Int. J. Syst. Bacterio.*, 45, 441 -448.
- Borsodi, A. K., Márialigeti, K., Szabò, G., Palatinszky, M., Pollák, B., Kéki Z., Kovács, A. L., Schumann, P. and Tóth, E. M. (2008).** *Bacillus aurantiacus* sp. nov., an alkaliphilic and moderately halophilic bacterium isolated from Hungarian soda lakes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 845–851.
- Boutaiba, S., Hacène, H., Bidle, K.A. and Maupin-Furlow, J.A. (2011).** Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameer and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. *Arid Environments*. 75 (10), 909-916.
- Boutoutaou, D. (1995).** *Evaporation des plans d'eau des retenues et barrages en Algérie.* Thèse doctorat d'Etat en Sciences Techniques. Institut d'Hydraulique, Moscou, Russie.
- Brock, T. D. (1965).** The road to Yellowstone-and Beyond. *Annual Review of Microbiology*, 49,1-28.
- Brock, T.D. et Freeze, H. (1969).** *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a non sporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.*, 98, 289-297.
- Bowers, K.J., Mesbah, N., Wiegel, M. (2009a).** Biodiversity of polyextremophilic bacteria: does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physicochemical boundary for life? *Saline Syst.*, 5-9.

Burns, D.G., Janssen, P.H., Itoh, T., Kamekura, M., Li, Z. and Jensen, G. (2007). *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57(Pt 2): 387–392.

Burns, D.G., Janssen, P.H., Itoh, T., Kamekura, M., Li, Z., Jensen, G., Rodríguez-Valera, F., Bolhuis, H. and Dyall-Smith, M.L. (2007). *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57, 387–392.

Burns, D.G., Janssen, P.H., Itoh, T., Kamekura, M., Echigo, A. and Dyall-Smith, M.L. (2010). *Halonotius pteroides* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon recovered from a saltern crystallizer. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1196-1199.

T

Carrasco, I. J., Márquez, M. C., Xue, Y., Ma, Y., Cowan, D. A., Jones, B. E., Grant, W. D. and Ventosa, A. (2007). *Bacillus chagannorensis* sp. nov., a moderate halophile from a soda lake in Inner Mongolia, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 2084–2088.

Castillo, A.M., Gutiérrez, M.C., Kamekura, M., Xue, Y., Ma, Y., Cown, D.A., Jones, B.E., Grant, W.D. and Ventosa, A. (2005). *Natrinema ejinorensis* sp. nov., isolated from a saline lake in Inner Mongolia, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 2683-2687.

Cerritos, R., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Herrera-Estrella, L., Alcaraz-Peraza, L. D., Arvizu-Gómez, J. L., Olmedo, G., Ramirez, E., Siefert, J. L. et Souza, V. (2008). *Bacillus coahuilensis* sp. nov., a moderately halophilic species from a desiccation lagoon in the Cuatro Ciénegas Valley in Coahuila, Mexico. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 919–923.

Chen, S.X., Zhao, Z.W., Zeng, C., and Yang, Z.L. (2013). Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene reveals high species diversity of *Halorubrum* in China. *African Journal of Microbiology Research*. Vol 7 (24), 3009- 3017.

Cho, B.C. (2005). Heterotrophic flagellates in hypersaline waters. In: Gunde-Cimerman, N., Oren, A., Plemenitaš A. (eds) *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria and Eukarya*. Springer, Dordrecht. Pp. 543–549.

Cui, H.L., Gao, X., Yang, X., Xu, X-W. (2011a). *Halolamina pelagica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Halobacteriaceae. *Appl Microbiol Biotechnol*, 61(7),1617-1621.

Cui, H-L., Gao, X., Sun, F-F., Dong, Y., Xu, X-W., Zhou, Y-G., Liu, H-C., Oren, A. and Zhou, P.J. (2010a). *Halogramum rubrum* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a marine solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 60,1366-1371.

Cui, H-L., Gao, X., Yang, X., Xu, X-W. (2010c). *Halorussus rarus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Halobacteriaceae isolated from a marine solar saltern. *Extremophiles*, 14 (6), 493-499.

Cui, H-L., Li, X-Y., Gao, X., Xu, X-W., Zhou, Y-G., Liu, H-C., Oren, A. and Zhou, P-J. (2010b). *Halopelagius inordinatus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Halobacteriaceae isolated from a marine solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60,2089-2093.

Cui, H-L., Yang, X., Gao, X. and Xu, X-W. (2011b). *Halobellus clavatus* gen. nov., sp. nov. and *Halorientalis regularis* gen. nov., sp. nov., two new members of the family Halobacteriaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61,2682-2689.

Cui, H.L., Tohty, D., Liu, H.C, Liu, S.J, Oren, A. and Zhou P.J. (2007). *Natronorubrum sulfidifaciens* sp. nov., an extremely haloalkaliphilic archaeon isolated from Aiding salt lake in Xin-Jiang, China. *Int J Syst and Evol Microbiol.* 57,738–740.

D

D’Amico, S., Collins, T., Marx, J.C., Feller, G. and Gerday, C. (2006). Psychrophilic micro-organisms : challenges for life. *EMBO* 7, 385-389.

De la Haba, R.R., Sánchez-Porro, C., Marquez, M. C. and Ventosa, A. (2011). Taxonomy of halophiles, In: Horikoshi K. (ed.), *Extremophiles Handbook*, Springer. P. 1248.

De Long, E.F., Wu, K Y., Prezelin, B.B. and Jovine, R.V. (1994). High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. *Nature*, 371, 695-697.

Demdoum, A. (2010). *Etude hydrogéochimique et impact de la pollution sur les eaux de la région d'El Eulma*. Thèse de Doctorat d'état en Géologie. Université Mentouri Constantine. Algérie.

Demmati, F., Samraoui, B. (2013). *Biodiversité et enjeux socio-économiques des lacs sales (chotts et sebkhas) d'Algérie. Cas de chott Merouane et Melghir*. Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques. Université Mohamed Kheider Biskra. Algérie.

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 edition., Volume Three, The Firmicutes*. Springer, New York, USA.

D.G.F. (2004). Atlas des zones humides algériennes d'importance internationales. Alger: D.G.F. ed.

Dohrmann, A.B., Müller, V. (1999). Chloride dependence of endospore germination in *Halobacillus halophilus*. *Arch Microbiol*, 172, 264-267.

Duckworth, A. W., Grant, W. D., Jones, B. E., Meijer, D., Marques, C. M. and Ventosa, A. (2000). *Halomonas magadii* sp.nov. a New Member of the Genus *Halomonas*, Isolated from a Soda Lake of the East African. *Extremophiles*, 4,53-60.

Dussault, H.P. (1955). An improved technique for staining red halophilic bacteria. *J. Bacteriol.*, 70,484-485.

E

Ebel, C., Faou, P., Kenel, B. & Zaccai, G. (1999). Relative Role of Anions and Cations in the Stabilization of Halophilic Malate Dehydrogenase. *Biochemistry*, 38, 9039-9047.

Echigo, A., Hino, M., Fukushima, T., Mizuki, T., Kamekura, M. and Usami, R. (2005). Endospores of halophilic bacteria of the family *Bacillaceae* isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm). *Saline Systems*, 1:8.

Echigo, A., Fukushima, T., Mizuki, T., Kamekura, M. and Usami, R. (2007). *Halalkalibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov., a novel moderately halophilic and alkaliphilic bacterium isolated from a non-saline soil sample in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1081–1085.

Edwards, T., Mormile, M.R. and Ventosa, A. (2015). *Halomonas eurialkalitolerans* sp. Nov., a novel halotolerant, alkaliphilic bacterium isolated from Soap Lake, Washington. *Int J Syst Evol Microbiol*.

Egorova, K., Antranikian, G. in Garrett, R.A., Klenk, H.P. (2007). Archaea: evolution, physiology, and molecular biology, Malden, USA, *Blackwell Publishing*, 295-321.

Elevi, R., Assa, P., Birbir, M., Ogan, A. & Oren, A. 2004. Characterization of extremely halophilic Archaea from the Ayvalik Saltern, Turkey. *World J Microbiol Biotechnol*, 00, 1-7.

Erauso, G., Reysenbach, A. L., Godfroy, A., Meunier, J. R., Crump, B., Partensky F., Baross, J. A., Marteinson, V., Barbier, G., Pace, N. R. and Prieur, D. (1993). *Pyrococcus abyssi* sp. nov. a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.*, 160,338-349.

F

Falagas, M.E., McDermott, L. and Snyderman, D.R. (1997). Effect of pH on in vitro antimicrobial susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group. *Antimicrob Agents Chemother*; 41: 2047-9.

Fan, H., Xue, Y., Ma, Y., Ventosa, A. & Grant, W. D. (2004). *Halorubrum tibetense* sp. nov., a novel haloalkaliphilic archaeon from Lake Zabuye in Tibet, China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54, 1213-1216.

Fardeau, M.L, Gounant, C., Dorléac, N., Cayol, J.L. and 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*, p 86.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

Fendrihan, S., Legat, A., Pfaffenhuemer, M., Gruber C., Weidler, G., Gerbl, F. and Stan-Lotter, H. (2006). Extremely halophilic Archaea and the issue of long-term microbial survival. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol*, 5(2-3), 203–218.

Feng, J.P., Zhou, Y., Zhou, S., Liu, Rhodes, K.W. (2005). *Halorubrum alkaliphilum* sp. nov., a novel haloalkaliphile isolated from a soda lake in Xinjiang, China. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 55,149-152.

Finegold, S.M. (1959). Kanamycin. *AMA archives of internal medicine*. 104: 15-28.

Florey, K. (1973). Analytical profiles of drug substances. *Academic Press*, New York,

Forkutsa, R., Sommer, J. P. A., Lamers, K., Kienzler, B., Tischbein, C., Martius P. L., Vlek, G. (2009). Modeling irrigated cotton with shallow groundwater in the Aral Sea Basin of Uzbekistan: II. Soil salinity dynamics. *Irrig Sci*, 27,319–330.

Futterer, O., Angelov, A., Liesegang, H., Gottschalk, G., Schleper, C., Schepers, B., Dock C., Antranikian, G. and Liebl, W. (2004). Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101, 9091-9096.



Gareeb, A.P. and Setati, M.E. (2009). Assessment of alkaliphilic haloarchaeal diversity in Sua pan evaporator ponds in Botswana. *African Journal of Biotechnology*, 8: 259-267.

Gasol, J.M., Casamayor, E.O., Joint, I., Garde, K., Gustavson, K., Benloch, S., Díez B., Schauer, M., Massana, R. & Pedrós-Alió C. 2004. Control of heterotrophic prokaryotic abundance and growth rate in hypersaline planktonic environments. *Aquat Microb Ecol*, 34, 193–206.

Gerday, C. and Glansdorff, N. (2007). Physiology and biochemistry of extremophiles. *ASM press, Washington, DC*. P. 450.

Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W.A. and Krieg, N.R. (1994). *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington DC, ASM, USA.

Ghozlan, H., Deif, H., Abu Kandil, R., Sabry R. (2006). Biodiversity of moderately halophilic bacteria in hypersaline habitats in Egypt. *J Gen Appl Microbiol*, 52,63–72.

Gibbons, N. E. (1974). Family V. *Halobacteriaceae* fam. nov. In *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. eighth ed. 269-273. Edited by R. E. Buchanan & N.E. Gibbons. Baltimore: Williams & Wilkins.

Godard, A., Tabeaud, M.(1993). *Les climats –mécismes et repartition*. Edition Arnaud Colin-Paris, p.168.

Grant, W.D., Tindall, B.J. The isolation of alkaliphilic bacteria. In *Microbial Growth and Survival in Extremes of Environment*. (1980). (Eds. G.W. Gould and J.G.L. Corry), pp 27-36. Academic Press. London.

Grant, W.D., Horikoshi, K. (1989). Alkaliphiles. In *Microbiology of Extreme Environments and its Potential for Biotechnology*, (Eds. M.S. Da Costa., J.C. Duarte and R.A.D. Williams), Elsevier-London, pp 346-366.

Grant, W.D., Horikoshi, K. Alkaliphiles; ecology and biotechnological applications. In *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles* . (1992). (Eds. R.A. Herbert and R.J. Sharpe), Blackie. Glasgow and London. pp 143-162.

Grant, W.D., Gemmell, R.T. and McGenity, T.J.. Halophiles. In *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*, eds. Horikoshi, K. & Grant, W.D. (1998). pp.93–132. Wiley-Liss, Inc. ISBN 0-471-02618-2.

Grant, W.D., Kamekura, M., Mcgenity, T.J. & Ventosa, A. (2001). Class III Halobacteria class. nov. Order I. Halobacteriales. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria vol 1*, eds. Boone, D.R. & Garrity, G.M. pp. 294–334. New York: Springer-Verlag. ISBN 0- 38798771-1.

Grant, S., Grant, W.D., Jones, B. E., Kato, C. and Li, L. (1999). Novel archaeal phylotypes from an East African alkaline saltern. *Extremophiles*, 3, 139–145.

Gregoire, P., Fardeau, M.L., Guasco, S., Bouanane, A., Michotey, V., Bonin, P., Dubourg K., Cambar, J. et Olivier, B. (2009). Les micro-organismes de l'extrême. *Press Therm Climat*, 146:49-61.

Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, S., Plemenitas, A. (2000). Hypersaline waters in salterns natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol Ecol*, 32: 235–240.

Gunde-Cimerman, N., Frisvad, J.C., Zalar, P. and Plemenitas, A. (2005). Halotolerant and halophilic fungi. In: Deshmukh S.K., Rai M.K. (eds), *Biodiversity of Fungi—Their Role in Human Life*. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi. Pp. 69–128.

Gutiérrez, M.C., Castillo, A.M., Corral, P., Minegishi, H. and Ventosa, A.(2010). *Natronorubrum sediminis* sp. nov., an archaeon isolated from a saline lake. *Int J Syst and Evol Microbiology*, 60, 1802–1806.

Gutiérrez, M.C., Castillo, A.M., Corral, P., Kamekura, M., Ventosa, A. (2011). *Halorubrum aquaticum* sp.nov., an archaeon isolated from hypersaline lakes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61, 1144 -1148.

H

Hacène, H., Rafa, F., Chehouni., N., Boutaiba S., Bhatnagar, T., Baratti, J.C., and Olivier, B. (2004). Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea Salt Lake, Algerian Sahara. *Journal of Arid Environments*, 58: 273-284.

Hachicha, M. (2007), Les sols salés et leur mise en valeur en Tunisie. *Sécheresse*, 18 (1), 45-50.

Hacini, M., Lamini, A. (2012). Etude géochimique et mineralogique des chotts de la région de El Hahjira. 2012. Mémoire de Magister, Option Géochimie de surface. UKMO. Algérie.

Hacini, M. (2006). *Géochimie des sels et des saumures du chott Merouane et calcule des vitesses de précipitation de quelques minéraux évaporitiques*, thèse de doctorat. Université Badji-Mokhtar Annaba-Algérie.

Hedi, A., Sadfi, N., Fardeau, M.L., Rebib, H., Cayol, J.L., Ollivier, B, and Boudabous, A. (2009). Studies on the Biodiversity of Halophilic Microorganisms Isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under Aerobic Conditions. *International Journal of Microbiology*. Article ID 731786, 17 p.

Henstra, A.M., Dijkema, C. and Stams, A.J.M. (2007). *Archaeoglobus fulgidus* couples CO oxidation to sulfate reduction and acetogenesis with transient formate accumulation. *Environmental Microbiology*, 9, 1836-1841.

Hess, M., Katzer, M. et Antranikian, G. (2008).Extremely thermostable esterases from the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus*. *Extremophiles*, 12(3), 351-364.

Hezayen, F.F., Tindall, B.J., Streinbüchel, A. and Rehm, B.H.A. (2002). Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestris* gen. nov., sp. Nov., and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. *Int. J. Syst. Evolut. Microbial*, 52, 2271-2280.

Hilpert, R., Winter, J., Hammes, W. and Kandler, O. (1981). The sensitivity of archaeobacteria to antibiotics. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig C* 2: 11–20.

Horikoshi, K. (1999a). Alkaliphilic: Some Applications of their products for biotechnology. *Microbe and Molecule Biol Rev.*, 63, 735-750.

Horikoshi, K. (2006). Alkaliphiles – Genetic properties and applications of enzymes. *Tokyo, Kodansha-Springer*, p. 258.

Hou, S., Larsen, R.W., Boudko, D., Riley, C.W., Karatan, E., Zimmer, M., Ordal, G.W. and Alam, M. (2000). Myoglobin-like aerotaxis transducers in Archaea and Bacteria. *Nature*, 403, 540–544.

Huber, R., Thomm, M., König, H., Thies, G. and Stetter, K.O. (1982). *Methanococcus thermolithotrophicus* a novel thermophilic lithotrophic methanogen. *Archive of Microbiology*, 132, 47-50.

J

Ihara, K., S. Watanab, and Tamura, T. (1997). *Haloarcula Argentinensis* sp. nov. and *Haloarcula mukohtaei* sp. nov., Two New Extremely Halophilic Archaea collected in Argentina ». *International Journal of systematic Bacteriology*, p 73-77.

Imadalou-Idres, N., Carré-Mlouka, A., Vandervennet, M., Yahiaoui, H., Peduzzi, J., and Rebuffat, S. (2013). Diversity and Antimicrobial Activity of Cultivable Halophilic Archaea from Three Algerian Sites. *Journal of Life Sciences*. 7(10), 1057-1069.

Inoue, K., Itoh, T., Ohkuma, M., Kogure, K. (2010). *Halomarina oriensis* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a seawater aquarium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61(4): 942-946.

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

Itoh, T., Yamagushi, T., Zhou, P. and Takashina, T. (2005). *Natronolimnobius baerhuensis* gen. nov., sp. nov., and *Natronolimnobius innermongolicus* sp. nov., novel haloalkaliphilic archaea isolated from soda lakes in inner Mongolia, China. *Extremophiles*, 9 : 111-116.

L

Jeon, C. O., Lim, J. M., Lee, J. M., Xu, L. H., Jiang, C. L. & Kim, C. J. (2005). Reclassification of *Bacillus haloalkaliphilus* Fritze 1996 as *Alkalibacillus haloalkaliphilus* gen. nov., comb. nov. and the description of *Alkalibacillus salilacus* sp. nov., a novel halophilic bacterium isolated from a salt lake in China. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 55, 1891–1896.

Joffin, J.N. and Leyral, G. (2006). *Microbiologie Technique. Tome 1, dictionnaire des techniques.* Académie de bordeaux et crdp d'Aquitaine, France.

Johnsen, U., Selig, M., Xavier, K.B., Santos, H. and Schönheit, P. (2001). Different glycolytic pathways for glucose and fructose in the halophilic archaeon *Halococcus saccharolyticus*. *Arch Microbiol.*, 175: 52–61.

Jones, B.E., Grant, W.D., Collins, N.C., Mwatha, W.E. (1994). Alkaliphiles: Diversity and Identification. In *Bacterial Diversity and Systematics*, (Ed. F.G. Priest), pp 195-230. Plenum Press. New York.

Jones, B. E., Grant, W. D., Duckworth, A. W. and Owenson, G. G. (1998). Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles*. 2, 191–200.

Joshi, R. (2006). *Extracellular Enzymes from halophilic and haloalkaliphilic bacteria isolated from seawater along the coastal Gujarat*. Ph.D diss. Saurashtra University.

℔

Kamekura, M. (1998). Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles*, 2(3): 289–295.

Kawakami, Y., Hayashi, N., Ema, M. et Nakayama, M. (2007). Effects of Divalent Cations on *Halobacterium salinarum* Cell Aggregation. *J. Biosci. Bioengi.* 104, 42-46.

Kharroub, K., Ouesada, T., Ferrer, R., Fuentes, S., Aguilera, M., Boulahrouf, A., Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sanchez, M. (2006). *Halorubrum ezzemoulenense* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from Ezzemoul sabkha, Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 56, 1583-1588.

Kharroub, K. (2007). *Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila)*. Thèse de doctorat, Université Mentouri-Constantine. Algérie.

Kiss Pappo, T. et Oren, A. (2000). Halocins can they involved in the competition between halobacteria » in Saltern Ponds. *Extremophiles*, 4: 35- 41.

Kiss-Pappo, T., Oren, A., Wasser, S.P., Nevo, E. (2003). Survival of filamentous fungi in hypersaline Dead Sea water. *Microb Ecol*, 45,183-190.

Klouche Khelil, N., Aissaoui, N., Nas, F., Cayol, J. L., and Ghellai, L. (2013). A Novel Halotolerant Bacterium Isolated from El Goléa Lake in Algeria and Antimicrobial Potential of this Strain. *Journal of Agricultural Science and Technology*, A3, 825-834.

Kristjansson, J. K., and Hreggvidsson, G. O. (1995). Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 17-25.

Kroll, R.G. (1991). Alkaliphiles. In *Microbiology of Extreme Environments*, (Ed. C. Edwards), pp 55-92. McGraw-Hill. New York.

Krulwich, T. A., Guffanti, A. A., Bornstein, R. F., & Hoffstein, J. (1982). A sodium requirement for growth, solute transport, and pH homeostasis in *Bacillus firmus* RAB. *J Biol Chem*, 257, 1885–1889.

Kurlansky, M. Salt : A world history. In : *Media and conditdions for the Growth of Halophilic and Halotolerant Bacteria and Archaea*. Schneegurt MA. (2012). R. H. Vreeland (ed.), *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*. doi 10.1007/978-94-007-5539-0_2, © Springer.

Kushner, D. J. Growth and nutrition of halophilic bacteria. In *The biology of halophilic bacteria*. Eds. R. H. Vreeland & L. I. (1993). Hochstein. pp. 87-103. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Lakzian, M. E., Astarai, A. A. R., Fotovat, A. and Besharati, H. (2016). Quantitative comparison of ammonia and 3-indoleacetic acid production in halophilic, alkalophilic and haloalkalophilic bacterial isolates in soil. *J Fundam Appl Sci.*, 8(2S), 653-673.

L

Landon, J.R. (1991). Booker Tropical Soil Manual; a Handbook for Soil Survey and Agricultural Land Evaluation in the Tropics and Subtropics. Longman, Essex, England. P 474.

Lergos, J.P. (2009). La salinisation des terres dans le monde. Conférence n°4069. Académie des Sciences et Lettres de Montpellier. Bull. n°40, pp. 257-269.

Lim, J. M., Jeon, C. O. & Kim, C. J. (2006a). *Bacillus taeanensis* sp. nov., a halophilic Gram-positive bacterium from a solar saltern in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 2903–2908.

Lim, J. M., Jeon, C. O., Lee, S. M., Xu, L. H., Jiang, C. L. and Kim C. J. (2006b). *Bacillus salarius* sp. nov., a halophilic, spore-forming bacterium isolated from a salt lake in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 373–377.

Lim, J. M., Lee, J.M., Jeon, C.O., Xu, L.H., Jeong, C.L. & Kim, C.J. (2005). Reclassification of *Bacillus haloalkaliphilus* Fritze 1996 as *Alkalibacillus haloalkaliphilus* gen.nov.,comb. nov.and the description of *Alkalibacillus saliacus* sp.nov., a novel halophilic bacterium isolated from a salt lake in China. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 55,1891-1896.

Litchfield, B. and Dalmet, S. (2009). Microbial diversity in hypersaline environments. Proceedings of the 2nd International Conference on the Ecological Importance of Solar Saltworks (CEISSA2009): Merida, Yucatan, Mexico, 26 – 29.

Litchfield, C. (1998). Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on Mars. *Meteorit planet. Sci.*, 33: 813-819.

Litchfield, C. D., Oren, A., Irby, A., Sikaroodi, M. & Gillevet, P. M. (2006). Temporal and salinity on the microbial diversity at the Eilat, Israel, Solar salt Plant. Proceedings of the 1st International Conference on the Ecological Importance of Solar Saltworks (CEISSA 06) Santorini Island, Greece, 20-22 October, 72-81.

Loftin, K., Adams, C., Meyer, M. and Surampalli, R. (2004). Hydrolysis of selected veterinary antibiotics and their chemical degradation in anaerobic swine lagoons. The Ninth Symposium on the Chemistry & Fate of Modern Pesticides, Vail, Colorado.

Lund, E. and John, W. (2007). Characteristics, development and utilization of geothermal resources. *Q. Bull*, 28, 1-9.

M

Madern, D., Ebel, C. & Zaccai, G. (2000). Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 4, 91-98.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker J. (2003). Prokaryotic diversity: Archaea. In Brock Biology of Microorganisms, 10th edn, pp. 446–452. New Jersey: Prentice Hall International. ISBN 0- 13049147-0.

- Madigan, M.T., Martinko, J.M. (2006).** Brock Biology of Microorganisms, 11th edition. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. Pp. 1012.
- Mancinelli, R.L. & Hochstein, L.I. (1986).** The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 35, 55–58.
- Mancinelli, R.L., Landheim, R., Sanchez-Porro, C., Dornmayr-Pfaffenhuemer, M., Gruber, C., Legat A. (2009).** *Halorubrum chaoviator* sp. nov., a haloarchaeon isolated from sea salt in Baja California, Mexico, Western Australia and Naxos, Greece. *Int J Syst Evol Microbiol*. 59, 1908–1913.
- Marlet, S. et Job, J.O. (2006).** Processus et gestion de la salinité des sols. In : Tiercelin, J.R. Traité d'irrigation, seconde édition. Tec & Doc Lavoisier. ISBN-13: 978-2743009106.
- Maturrano, L., Santos, F., Rossello-Mora, R., and Anton, J. (2006).** Microbial diversity in Maras salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(6), 3887– 3895.
- McGenity, T. J. & Grant, W. D. (1995).** Transfer of *Halobacterium saccharovororum*, *Halobacterium sodomense*, *Halobacterium trapanicum* NRC 34021 and *Halobacterium lacusprofundi* to the genus *Halorubrum* gen. nov., as *Halorubrum saccharovororum* comb. nov., *Halorubrum sodomense* comb. nov., *Halorubrum trapanicum* comb. nov., and *Halorubrum lacusprofundi* comb. nov. *Syst Appl Microbiol.*, 18, 237–243.
- Mesbah, N. M., Hedrick, D. B., Peacock, A. D., Rohde, M. and Wiegel J. (2007).** *Natranaerobius thermophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic, alkalithermophilic bacterium from soda lakes of the Wadi An Natrun, Egypt, and proposal of *Natranaerobiaceae* fam. nov. and *Natranaerobiales* ord. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 2507-2512.
- Mesbah, N.M. and Wiegel J. (2008).** Life at extreme limits: the anaerobic halophilic alkalithermophiles. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125: 44-57.
- Mesbah, N.M., Wiegel, J. (2012).** Life under Multiple Extreme Conditions: Diversity and Physiology of the Halophilic Alkalithermophiles. *AEM.*, 28, 4047-4082.
- Minegishi, H., Echigo, A., Nagaoka, S., Kamekura, M., Usami, R. (2010).** *Halarchaeum acidiphilum* gen. nov., sp. nov., a moderately acidophilic haloarchaeon isolated from commercial solar salt. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60,2513-2516.
- Mormile, M. R., Biesen, M. A., Gutiérrez, M. C., Ventosa, A., Paviovich, J. B., Onstott, T. C. & Fredrickson J. K. (2003).** Isolation of *Halobacterium salinarum* retrieved directly from halite brine inclusions. *Environ Microbiol*, 5, 1094-1102.
- Morozkina, E.V., Slutskaya, E.S., Fedorova, T.V., Tugay, T.I., Golubeva, L.I. and Koroleva, O.V. (2010).** Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46: 1-14.
- Musy, A. (2004).** Cours hydrologie générale. Ecole polytechnique Fédérale. Lausanne.

N

Nezli, I. (2004) : *Mécanismes d'acquisition de la salinité et de la fluoruration des eaux de la nappe phréatique de la basse Vallée de l'Oued Mya (Ouargla).* Mémoire de Magister. Université Badji Mokhtar. Annaba. 45- 47.

Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 711-729.

Norris, J.R., Ribbons, D.W. (1971). Methods in Microbiology. Vol. 6A, Academic Press, 1-52: 0580-9517.

Norton, C.F. Rediscovering the ecology of halobacteria. In: The ecology of the extremely halophilic archaea. Oren A. (1994). *FEMS Microbiology Reviews.*, 13,415-440.



Oren, A. (1990b). The use of protein synthesis inhibitors in the estimation of the contribution of halophilic archaeobacteria to bacterial activity in hypersaline environments. *FEMS Microbiol Ecol*, 73, 187-192.

Oren, A. (1991). Estimation of the contribution of archaeobacteria and eubacteria to the bacterial biomass and activity in hypersaline ecosystems: novel approaches. General and Applied Aspects of Halophilic Bacteria (Rodriguez-Valera F, ed), pp. 25-31. Plenum Publishing Company, New York.

Oren, A. (1993). Ecology of extremely halophilic microorganisms. In The Biology of Halophilic Bacteria, eds. Vreeland, R.H. & Hochstein, L.I. pp. 25-53. Boca Raton: CRC Press ISBN 0-84938841-4.

Oren, A. (1994). The ecology of the extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiol Rev*, 13,415-440.

Oren, A., Gurevich, P., Gemmell, T.R. et Teske, A. (1995). *Halobaculum gomorrense* gen. nov., sp. Nov., a novel extremely Halophilic Archaeon from the dead sea. *International journal of systematic bacteriology*, 4, 747- 754.

Oren, A. (1997). Proposed minimal standards for description of new taxa in the order Halobacteriales. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47:233-236.

Oren, A., Ventosa, A., Carmen Gutierrez, M. et Kamekura, M. (1999). *Haloarcula quadrata* sp. Nov., a square, motile archaeon isolated from a brine pool in Sinai (Egypt). *International Journal of systematic Bacteriology*, 49,1149-1155.

Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 63, 334-348.

Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industria Microbiology and Biotechnology*, 28, 56-63.

Oren, A., R. Elevi, S. Watanabe, Ihara, K., and Corcelli, A. (2002). *Halomicrobium mukohataei* gen. Nov., comb. Nov., and emended description of *Halomicrobium mukohataei*. *International Journal of systematic and evolutionary Microbiology*, 52: 1831-1835.

Oren. A. (2002a). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 28, 56-63.

Oren, et al. (2002b). Halophilic Microorganisms and their Environments. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*. 128-138; 575.

Oren, A. and Mana, L. (2003). Sugar metabolism in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *FEMS Microbiol Lett*, 223, 83-87.

Oren, A. (2006). Life at High Salt Concentrations. *Prokaryotes*. 2:263-282.

Oren, A. (2006). The order Halobacteriales. The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria, Vol 3, 3rd edn (Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH & Stackebrandt E eds), pp. 113–164. Springer, New York.

Oren, A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4:2.

Oren, A. (2011). Ecology of halophiles. In: Extremophiles Handbook Horikoshi K, Antranikian G, Bull A, Robb F, Stetter K (eds). Springer, Heidelberg. 334-361.

Oren, A. (2012). Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. Andrei, A.S., Banciu HL and Oren, A. *FEMS Microbiol Lett* 330,1-9.

Oren, A. Diversity of halophiles. In living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. Andrei AS, Banciu HL and Oren A. (2012). *FEMS Microbiol Lett*, 330. 1-9.

Ochsenreiter, T., Pfeifer, F. and Schleper, C. (2002). Diversity of *Archaea* in hypersaline environments characterized by molecular– phylogenetic and cultivation studies. *Extremophiles*, 6(4), 267–274.

Ozcan, B, Gulay, O, Arzu, C., and Cumhur. (2007). Diversity of Halophilic Archaea From Six Hypersaline Environments in Turkey. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17(5), 745–752.

P

Panagiotis, L.K., Papandreou, N.C. et Hamodrakas, S.J. (2007). Haloadaptation: Insights from comparative modelling studies of halophilic archaeal DHFRs. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41,447-453.

Park, J.S., Vreeland, R.H., Cho, B.C., Lowenstein, T.K., Timofeeff, M.N., Rosenzweig W.D. (2009). Haloarchaeal diversity in 23, 121 and 419 MYA salts. *Geobiology* 7(5),515-523.

Pasic, L., Bartual, S.G., Ulrich, N.P., Grabnar, M., and Velikonja, B.H. (2005). Diversity of halophilic archaea in the crystallizers of an Adriatic solar saltern. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 54(3), 491– 498.

Pecher, T. and Bock, .A. (1981). In vivo susceptibility of halophilic and methanogenic organisms to protein synthesis inhibitors. *FEMS Microbiol Lett.*, 10, 295–297.

Pedersen, K., Nilsson, E., Arlinger, J., Hallbeck, L. and O'Neill, A. (2004). Distribution, diversity and activity of microorganisms in the hyper-alkaline spring waters of Maqarin in Jordan. *Extremophiles*; 8: 151-164.

Pedros-Alio, C., Calderon-Paz, J.I., MacLean, M.H., Medina, G., Marasse, C., Gasol, J.M. and Guixa-Boixereu N. (2000). The microbial food web along salinity gradients. *FEMS Microbiol Ecol*, 32, 143–155.

Pérez-Davo, A., Aquilera, M., Ramos-Cormenzana, A. and Monteoliva-Sanchez, M. (2014). *Alkalibacillus almallahensis* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from an inland solar saltern. *Int Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.64,2066-2071.

Perry, J.J., Staley T.J., Lory S. (2004). Microbiologie « Cours et questions de révision» Ed. Dunod, pp 397- 403.

Pesenti, P.T., Sikaroodi, M., Gillevet, P.M., Sanchez-Porro, C., Ventosa, A, and Litchfield, C.D. (2008). *Halorubrum californiens* sp.nov., an extreme archaeal halophile isolated from a crystalizer pond at a solar salt plant in California, USA. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 58, 2710-2715.

Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., et al. (2000). *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 50 (6), 2109-17.

Pikuta, E.V., Hoover, R.B. (2007). Microbial Extremophiles at the Limits of Life. *Critical Reviews in Microbiology*, 33,183–209.

Post, F.J. The microbial ecology of the Great Salt Lake. In: The ecology of the extremely halophilic archaea. Oren, A. (1994). *FEMS Microbiology Reviews.*, 13, 415-440.

Prakash, B., Vidyasagar, M., Madhukumar, M.S., Muralikrishna, G. and Sreeramulu, K. (2009). Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α -amylase from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochemical*, 44, 210-215.

Q

Quesada, E., Bejar, V., Valderrama, M. J. and Ramos-Cormenzana, A. (1987). Growth characteristics and salt requirement of *Delaya halophila* in a defined medium. *Curr. Microbiol.*, 16, 21-25.

R

Raval, V.H., Pillai, S, Rawal, C.M., Singh, S.P. (2014a). Biochemical and structural characterization of a detergent stable serine alkaline protease from sea water haloalkaliphilic bacteria. *Process Biochem*, 49(6), 955-962.

Raval, V.H., Rawal, C.M., Bhatt, H.D., Dahima, B.R., Pandey, S, Singh SP (2014b). Cloning and molecular characterization of serine protease from sea water haloalkaliphilic bacteria. *Ann Microbiol.* doi : 10.1007/s13213-014-0869-0.

Rawal, C. M., Raval, V. H., Bhimani, H. D., Bhensdadia, D. V., Kothari, C. R., Patel, A. B., Bhatt, V. D., Parmar, N. R., Sajnani, M. R., Koringa, P. G., Joshi, C. G., Kothari, R. K., and Singha, S. P. (2012). Whole-Genome Shotgun Sequencing of the Extremophile *Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5, of Indian Origin. *Journal of Bacteriology*,4775. ASM. doi:10.1128/JB.01031-12.

Rawal, N., Kelkar, S. M., and Altekar, W. (1988). Alternative routes of carbohydrate metabolism in halophilic archaeobacteria. *Indian J Biochim Biophys*, 25, 674-686.

- Regna, P.P., Wasselle, L.A., Solomons, I. (1964).** The stability of streptomycin. *J. Biol Chem.* 165, 631-638.
- Réménieras, G. (1999).** L'hydrologie de l'ingénieur. 2^{ème} édition, Ed. Eyrolles, p.451.
- Rodier, J, Bazin, C, Broutin, JP, Chambon, P, Champseur, H, Rodi, L. (1996).** L'analyse de l'eau : Eaux naturelles, eau résiduaire, eau de mer. Eighth ed. Dunod, Paris.
- Rodriguez-Valera, F., Ventosa A., Juez, G., Imhoff, J.F. (1985).** Variation of environmental features and microbial population with salt concentration in a multipond saltern. *Microb Ecol* 11, 107–115.
- Rodriguez-Valera, F. 1988.** Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. In Halophilic Bacteria. 1988; vol. 1, pp 3-30. Edited by F. Rodriguez-Valera. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Rodriguez-Valera, F. (1993).** Introduction to saline environments. In The Biology of Halophilic Bacteria. 1993. (Eds. R.H. Vreeland and L.I. Hochstein), pp 1-20. CRC Press Inc. Boca Raton.
- Rodriguez M.R., Russell, H., Vreeland, R.H., Oren A., Kessel, M., Betancourt C., Lopez, G. (1998).** *Halogeometricum borinquense* gen. nov. sp. nov. a novel halophilic archeon from Puerto Rico. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48,1305-1312.
- Roebler, M., Wanner, G., Müller, V. (2000).** Motility and flagellum synthesis in *Halobacillus halophilus* are chloride dependent. *J Bacteriol*, 182, 532-535.
- Roebler, M., Müller, V. (2002).** Chloride, a new environmental signal molecule involved in gene regulation in a moderately halophilic bacterium, *Halobacillus halophilus*. *J Bacteriol*, 184, 6207-6215.
- Rohwerder, T. and Sand, W. (2007).** Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. *Engineering in Life Sciences*, 7,301-309.
- Romano, I., Lama, L., Nicolaus, B., Gambacorta, A. & Giordano, A. (2005).** *Alkalibacillus filiformis* sp. nov., isolated from a mineral pool in Campania, Italy. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, 2395–2399.
- Rossello-Mora, R., Lee, N., Anton, J., and Wagner, M. (2003).** Substrate uptake in extremely halophilic microbial communities revealed by microautoradiography and fluorescence in situ hybridization. *Extremophiles*, 7(5), 409–413.
- Roxana, C., Simona, M., Gabriela, P., Lucia, D., Kamekura, M. and Mădălin, E. (2009).** Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal. *Romanian Biotechnological Letters*, 14 (5), 4658-4664.



- Saju, K., A., Michael Babu, M., Murugan, M., and Thiravia, Raj. S. (2011).** Survey on Halophilic microbial diversity of Kovalam Saltpans in Kanyakumari District and its industrial applications. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01 (05), 160-163.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

- Saker, M., Zedouri, A., et Boutelli, M.H. (2012).** *Salinité des eaux et des sols au niveau de Sebkhia Bamendil. Caractérisation et conséquences sur l'environnement.* Mémoire de Magister en Hydraulique. Option Aménagement hydrauliques dans les milieux arides. UKMO.Algérie
- Sarethy, I. P., Saxena, Y., Kapoor, A., Sharma, M., Sharma, S. K., Gupta, V. and Gupta, S. (2011).** Alkaliphilic bacteria : applications in industrial biotechnology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38,769–790.
- Satyanarayana, T., Raghukumar, C., and Shivaji, S. (2005).** Extremophilic microbes: Diversity and perspectives: *Current science*, 89, 78-90.
- Selama, O., Gregory, A. C. A., Djenane, Z., Borsetto, C., Laidi, R. F., Porter, D., Nateche, F., Wellington, E.M. H. and Hacène, H. (2014).** Screening for Genes Coding for Putative Antitumor Compounds, Antimicrobial and Enzymatic Activities from Haloalkalitolerant and Haloalkaliphilic Bacteria Strains of Algerian Sahara Soils. *BioMed Research International*. .doi.org/10.1155/2014/317524.
- Schleper, C., Puhler, G., Klenk, H.P., and Zillig, W. (1996).** *Picrophilus oshimae* and *Picrophilus torridus* fam. nov., gen. nov., sp. nov., two species of hyperacidophilic, thermophilic, heterotrophic, aerobic archaea. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 814–816.
- Setyorini, E., Takenaka, S., Murakami, S. and Aoki, K. (2006).** Purification and characterization of two novel halotolerant extracellular protease from *Bacillus subtilis* strain FP-133. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, 433-440.
- Shegal, S.N., Gibbons N.E. (1960).** Effect of metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Can. Journ. Microbiol.*, 6, 165-169.
- Shimane, Y., Hatada, Y., Minegishi, H., Mizuki, T., Echigo, A., Miyazaki, M., Ohta, Y., Usami, R., Grant, W.D., Horikoshi, K. (2010).** *Natronoarchaeum mannanyticum* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic archaeon isolated from commercial salt. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 2529-2534.
- Shimane, Y., Hatada, Y., Minegishi, H., Echigo, A., Nagaoka, S., Miyazaki, M., Ohta, Y., Maruyama, T., Usami, R., Grant, W.D., Horikoshi, K. (2011).** *Salarchaeum japonicum* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the Archaea isolated from commercial salt. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 61(9),2266-2270.
- Simone, R.M, Popino, R.P. (1955).** The stability of neomycin in several pharmaceutical preparations. *J Am Pharm Assoc.*, 44,275-280.
- Srivastava, P, Kowshik, M. (2013).** Mechanisms of metal resistance and homeostasis in haloarchaea. *Archaea*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/732864>
- Stan-Lotter, H., T.J. McGenity, A. Legat, E.B.M. Denner, K. Glaser, Stetter, K. and Wanner, G. (1999).** Very similar strains of *Halococcus salifodinae* are found in geographically separated permo-Triassic salt deposits. *Microbiology*, 145, 3565-3574.
- Stetter, K. O. (1996).** Hyperthermophiles in the history of life. *Ciba Found. Symp.* 202: 1-18.
- Stetter, K. (2006).** Hyperthermophiles in the history of life. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 361, 1837-1842.

Sultana, N., Hassan, F., Hasan, S.M.F., Hasan, S., Ahmed, F.I., Abbasi, Y.F. (2013). Effect of pH on the Dissolution of Erythromycin Stearate Tablets Available in Local Market. *Int J Pharm Sci Rev Res.*, 22, 235-239.

T

Takai, K., Neelson, K.H. and Horikoshi, K. (2004 b). *Methanotorris formicicus* sp. nov., a novel extremely thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a black smoker chimney in the Central Indian Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1095-1100.

Takashima, T., Hamamoto, T., Otazai, K., Grant, W.D., and Horikoshi, K. (1990). *Haloarcula japonica* sp.nov. a new triangular halophilic archaeobacterium. *System. Appl. Microbiol.*,13,177-181.

Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*

Tigulan, S.M., Davis, D., Hadid, H., Kasparian, I., Shim, S.S. and Murray, K.S. (2006). Halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow groundwater along the rouge river of Southern Michigan, *Enviroment Technology*, 28, 297-307.

Trigui, H., Masmoudi, S., Brochier-Armanet, C., Maalej, S. and Dukan, S. (2011). Characterization of *Halorubrum sfaxense* sp. nov., a New Halophilic Archaeon isolated from the Solar Saltern of Sfax in Tunisia. Hindawi Publishing Corporation. *I. Journal of Microbiology*. doi:10.1155/2011/240191.

Tomlison, G.A., Hochstein, L.I. (1976). *Halobacterium saccharovororum* sp.nov., a carbohydrate- metabolizing, extremely halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 22,587-591.

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case C.L. (2003). Introduction à la microbiologie. Ed. De Renouveau pédagogique Inc. 157-355.

U

Usami, R., Echigo, A., Fukushima, T., Mizuki, T., Yoshida, Y. And Kamekura M. (2007). *Alkalibacillus silvisoli* sp. nov., an alkaliphilic moderate halophile isolated from non-saline forest soil in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57, 770–774.

Upasani, V., Desai, S. Chemical. (1990). Composition of the brines and studies on haloalkaliphilic archabacteria. *Arch Microbiol.*,154, 589-593.

Ulrih, N.P., Gmajner, D. and Raspor, P. (2009). Structural and physicochemical properties of polar lipids from thermophilic archaea. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84:249-260.

V

- Van Den Burg, B. (2003).** Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr. Opin. Microbiol*, 6, 213–218.
- Ventosa, A., Nieto, J. J. and Oren, A. (1998).** Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(2), 504-544.
- Ventosa, A. (2006).** Unusual micro-organisms from unusual habitats. SGM Symposium 66: Procaryotic diversity-mechanisms and significance. Editors Logan, N.A., Lappin- Scott, H.M., & Oyston, P.F. Cambridge University Press. 223-253.
- Vidyasagar, M., Prakash, S., Mahajan, V., Shouche, Y.S. and Sreeramulu, K. (2009).** Purification and characterization of an extreme halothermophilic protease from a halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. TVSP101. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 12-19.
- Vincent, W. F., Mueller, D. R. and Bonilla, S. (2004).** Ecosystems on ice: the microbial ecology of Markham Ice Shelf in the high Arctic. *Cryobiology* 48,103–112.
- Vreeland, R.H. (1993).** Taxonomy of Halophilic Bacteria. In: The biology of halophilic bacteria. Vreeland R.H. and Hochstein L.I. (eds), CRC. pRESS, USA. 105-134.
- Vreeland R. H., Rosenzweig W. D. and Powers D. W. (2000).** Isolation of a 250 million year- old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* 407, 897-900.

W

- Walsh, C. (2003).** Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. Vol 9. Washington, D.C.: ASM Press.
- Wang, Q. F., Li W., Liu, Y. L., Cao, H. H., Li, Z. and Guo, G. Q. (2007).** *Bacillus qingdaonensis* sp. nov., a moderately haloalkaliphilic bacterium isolated from a crude sea-salt sample collected near Qingdao in eastern China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 1143–1147.
- Weisser, J. and Trüper, H. G. (1985).** Osmoregulation in a new haloalkaliphilic *Bacillus* from the Wadi Natrun (Egypt). *Syst. Appl. Microbiol.*, 6,7–11.
- Wen, H.Y., Yang, L., Shen, L.L., Hu, B., ZY, L. and Jin, Q.J. (2009).** Isolation and characterization of culturable halophilic microorganisms of salt ponds in Lianyungang, China. *World J Microbiol Biotechnol*, 25, 1727-1732.
- Woese, C. R. and Fox, G. E. (1977).** The concept of Cellular Evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 10: 1-6.

X

- Xin, Li., Hui-Yin, Yu., and Yi-Feng L. (2012).** Purification and characterization of an extracellular esterase from a moderately halophilic bacterium, *Halobacillus* sp. strain LY5. *African Journal of Biotechnology*, 11(23), 6327-6334.
- Xu, Y., Zhou, P. and Tian, X. (1999).** Characterization of two novel haloalkaliphilic archaea *Natronorubrum bangense* gen. nov., sp. nov. and *Natronorubrum tibetense* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacterio.*, 49, 26 1-266.

Y

- Yachai, M. (2009).** *Carotenoid production by halophilic Archaea and its applications.* Thesis of Doctorat, university Prince of Songkla. P. 173.
- 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 m in the deep sea. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 777-805.
- Yeon, S.H., Jeong, W.J. and Park, J.S. (2005).** The diversity of culturable organotrophic bacteria from local salterns. *J Microbiol*, 43,1-10.
- Yim, K.J., Cha, I.T., Lee, H.W., Song, H.S., Kim, K.N., Lee, S.J., et al. (2014).** *Halorubrum halophilum* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a salt- from a salt-fermented seafood. *Antonie van Leeuwenhoek*,105, 603-612.
- Yoon, J. H., Kang, S. J., Jung, Y. T., Lee, M. H. and Oh, T. K. (2010).** *Alkalibacillus flavidus* sp. nov., isolated from a marine solar saltern. *Int J SystEvolMicrobiol*, 60: 434-438.
- Yumoto, I., Hirota, K., Goto, T., Nodasaka, Y. and Nakajima, K. (2005).** *Bacillus oshimensis* sp. nov., a moderately halophilic, non-motile alkaliphile. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 907-911.

Z

- Zadi Karam, H., Boublenza, F., Baghdad, B., Semar, F. Z. (2012).** Etude du stress osmotique acide et thermique chez les Lactobacilles. Mémoire de Magister en Biotechnologie. Option Génie Microbiologique. Université d'Oran.
- Zalar, P., De Hoog, G.S., Gunde-Cimerman, N. (1999).** Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. *Studies in Mycology*, 43, 38-48.
- Zeng, X, Birrien, J.L., Fouquet, Y., Cherkashov, G., Jebbar, M., Querellou, J. (2009).** *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile : extending the upper pressure-temperature limits for life. *ISME Journal.*, 1-4.

Annexes

Annexes

Annexe 01 : Tableau 17: Exemples d'halophiles et halotolérants et solutés organiques compatibles.

Soluté organique compatible	Exemple
Glycine bétaine	Halotolérant: <i>Thioalkalivibrio versutus</i> ; <i>Actinopolyspora</i> sp. Halophile: <i>Actinopolyspora halophila</i> ; <i>Halorhodospira halochloris</i> <i>Methanohalophilus portulcalensis</i> ; <i>Methanosarcina thermophila</i> ; <i>Synechococcus</i> sp.
Ectoïne	Halotolérant: <i>Sporosarcina pasteurii</i> .; <i>Brevibacterium epidermidis</i> ; <i>Thioalkalimicrobium aerophilum</i> ; <i>Vibrio cholerae</i> and <i>V. costociola</i> Halophile: <i>Chromohalobacter israelensis</i> ; <i>Chromohalobacter salexigens</i> ; <i>Halorhodospira halochloris</i> ; <i>Halomonas elongata</i> , <i>H. variabilis</i> and phylogenetically related organisms; <i>Methylarcula marina</i> and <i>M. terricola</i> ; <i>Methylophaga alcalica</i> and <i>Methylophaga natronic</i>
Nε-acetyl-β-lysine	Halotolérant: <i>Methanosarcina thermophila</i> ; <i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i> ; <i>Methanosarcina mazei</i> Halophile: <i>Methanohalophilus portulcalensis</i> ; <i>Methanohalophilus</i>
Tréhalose	Halotolérant: <i>Pyrobaculum aerophilum</i> ; <i>Sulfolobus solfataricus</i> and <i>S. ambivalens</i> ; <i>Thermoproteus tenax</i> ; <i>Thermoplasma acidophilum</i> Halophile: <i>Actinopolyspora halophila</i> ; <i>Chromohalobacter israelensis</i> ; <i>Desulfovibrio halophilus</i> ; <i>Rhodothermus obamensis</i> .

Annexe 2. Appareils de mesure et d'analyse utilisés et phase d'enrichissement



pH-metre de type WTW



Conductimètre modèle Delta OHM- (HD 3406.2)



Spectrophotomètre DR 2000.



Photomètre DrLANGE(JENWAY)



Enrichissement sur milieu liquide des échantillons de saumures et de sédiments prélevés des deux sebkhas

Annexe 3 : Calcul de l'évaporation

- **Formule de Boutoutaou**

La formule de calcul de l'évaporation des plans d'eau pour les conditions climatiques de l'Algérie, exprime l'évaporation aux moyens de la température, de l'humidité de l'air et de la vitesse du vent (**Boutoutaou, 1995**).

Pour le sud de l'Algérie : (zones arides et semi-arides)

$$E = 0,342 \cdot n \cdot D^{0,73} (1 + 0,39V_2)$$

E – Évaporation en mm/mois ;

n – Nombre de jours du mois considéré. (Pour janvier $n=31$, pour février $n=28,5$, pour mars $n=31$ etc.)

V_2 – vitesse du vent mesurée à une hauteur de 2 mètre du sol, en m/s;

$$V_2 = 0,77 \cdot V$$

V – Vitesse du vent mesurée à la station météorologique en m/s

D – Déficit de saturation de l'air en mb (millibars), donné par la relation suivante :

$$D = 0,0632(100 - H)e^{0,0632(t)}$$

H – Humidité moyenne mensuelle de l'air en % ;

t – Température moyenne mensuelle de l'air en °C.

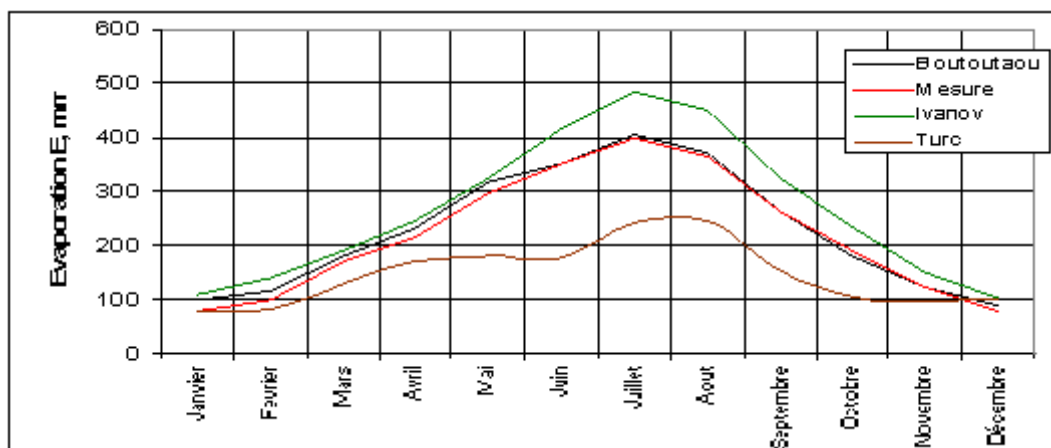


Figure 37: Récapitulatif des résultats des trois méthodes de calcul montrant l'écart d'estimation de l'évaporation

Annexe 4 : Résultats des analyses physico-chimiques et microbiologiques des différents échantillons

Site 1 : Moyenne mensuelle des analyses physico-chimiques (mg/ml)

Site 1 : Oum Eraneb	T°	pH	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	HCO ₃ ⁻	CO ₃ ⁻⁻	Cl ⁻	SO ₄ ⁻	CO ₂
Janvier	11,02	8,2	5718,75	1836,37	15395	626,75	21,41	0,23	20780,5	17138,25	0,28
Février	11,55	8,43	17187,5	8192	106667,5	5500	737,45	33,24	130562,5	138250	3,75
Mars	10	8,52	3830,75	2638,25	18490,5	1491,12	522,15	29,63	26451,25	20843,75	3,81
Avril	19,25	9,11	1602,5	2235,5	11201	1121,67	1465,77	93,13	15688,25	12812,5	0,69
Mai	25	8,65	1999	4686,75	50355,25	994,75	406,8	56,47	64428,5	48585,75	1,20
Juin	25	8,54	1040	1752,22	11260,25	235,25	404,9	41,46	16005,25	11954,25	0,85

Site 2 : Moyenne mensuelle des analyses physico-chimiques (mg/ml)

Site 2 Ain El Beida	T	pH	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	HCO ₃	CO ₃	Cl	SO ₄	CO ₂
Janvier	11,6	7,86	2589,75	7971	93241,75	2028,5	457,84	101,47	121970	68395,25	1,51
Février	11,75	8,7	11185,75	5922,75	94592,75	2698,25	313,32	221,59	114202,5	91060,5	0,61
Mars	12,15	8,96	2686	4830,25	96781,25	1779	376,76	136,61	134843,25	66428,5	0,69
Avril	25	9,53	2520	7305	86644,25	2102,5	332,62	326,69	122077	23460,25	0,16
Mai	25	8,99	2482,5	8422,5	73345,25	1793,5	443,06	170,55	114531,37	69869,25	0,63
Juin	25	8,33	2940	8092,25	110684,5	1951	494	22,98	172182,25	31747,5	2,45



مركز تكنولوجي البيئة
CENTRE INTERNATIONAL DES TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT DE TUNIS

Boulevard du Leader Yasser ARAFAT 1080, La Cherguia, Tunis
Tel. : 71 206482 / 71 206486 - Fax. : 71 206642
Site web : <http://www.citet.nat.tn> - E-mail : boo@botet.nat.tn



مركز تكنولوجي البيئة
CENTRE INTERNATIONAL DES TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT DE TUNIS

Boulevard du Leader Yasser ARAFAT 1080, La Cherguia, Tunis
Tel. : 71 206482 / 71 206486 - Fax. : 71 206642
Site web : <http://www.citet.nat.tn> - E-mail : boo@botet.nat.tn



Page 1 / 2

RAPPORT D'ESSAIS

Identification : 01/0533/13

Date de réception : 13/09/13

1- DEMANDEUR

Mme Khaléf Sakina

2- DESCRIPTION DE (s) L'OBJET (s) SOUMIS A L'ESSAI

Sept échantillons de sédiments.

3- ESSAI (s) DEMANDE (s)

pH, Conductivité, Salinité, Calcium, Magnésium, Sodium, Potassium, Carbonate, Sulfate, Chlorure, Nitrate.

4- METHODES D'ANALYSES

ESSAIS	METHODES	REFERENCES
p H	Electrochimie	NF T 90-008 (2001)
Conductivité, Salinité	Electrochimie	NF EN 27 - 888 (1994)
Calcium, Magnésium, Sodium, Potassium	Minéralisation	
	Emission Atomique-ICP	ISO 11885 (2007)
Sulfate, Chlorure, Nitrate	Extraction selon la méthode 1/5 (10g dans 50ml d'eau)	-
	Chromatographie ionique	ISO 10304-1 (2007)
Carbonate	Méthode par calcimètre de Bernard	-

5- RESULTATS:

Essai	Unité	Date d'exécution	OR1	OR2	OR3	OR4
p H	-	25/09/13	8,8 à 25,1C*	8,4 à 24,8C*	8,1 à 24,7C*	8,0 à 25,7C*
Conductivité	mS/m	25/09/13	1,84 10 ³	2,16 10 ³	3,35 10 ³	3,73 10 ³
Salinité	‰	25/09/13	10,9	13,0	21,1	23,5
Calcium	g/kg MS	25/09/13	21,9	16,5	34,1	24,8
Magnésium	g/kg MS	25/09/13	7,89	38,4	17,1	25,7
Sodium	g/kg MS	25/09/13	17,1	21,5	24,1	47,7

Ce rapport d'essai ne constitue que les observations à l'essai. Il constitue l'opinion de l'analyste et
il ne doit pas être considéré comme preuve juridique sans l'approbation de CET ET

Certaines prestations rapportées dans ce document ne sont pas couvertes par l'accréditation. Elles sont identifiées par le symbole (*)

Page 2 / 2

RAPPORT D'ESSAIS

Identification : 01/0533/13

Date de réception : 13/09/13

Essai	Unité	Date d'exécution	OR1	OR2	OR3	OR4
Potassium	g/kg MS	25/09/13	1,54	4,49	0,29	3,78
Sulfate	g/kgMS	01/10/13	35,6	34,7	22,8	28,2
Chlorure	g/kgMS	01/10/13	14,9	30	38,2	73,5
Nitrate	mg/kgMS	01/10/13	<2,5	<2,5	40,7	<2,5
carbonates	g/kgMS	30/09/13	73,5	61,2	65,6	81,4

Essai	Unité	Date d'exécution	AB1	AB2	AB3
p H	-	25/09/13	9,0 à 25,0C*	8,9 à 25,6C*	8,7 à 25,7C*
Conductivité	mS/m	25/09/13	2,85 10 ³	2,96 10 ³	4,17 10 ³
Salinité	‰	25/09/13	17,5	21,1	26,9
Calcium	g/kg MS	25/09/13	105	88,9	131
Magnésium	g/kg MS	25/09/13	37,7	21,8	27,7
Sodium	g/kg MS	25/09/13	51,4	38,4	63,2
Potassium	g/kg MS	25/09/13	2,91	8,29	3,32
Sulfate	g/kgMS	01/10/13	102	67,2	68,2
Chlorure	g/kgMS	01/10/13	28,7	54,2	71,3
Nitrate	mg/kgMS	01/10/13	<2,5	16,8	3,16
carbonates	g/kgMS	30/09/13	130	93,1	107

Edité, le 02/10/13

Ce rapport d'essai ne constitue que les observations à l'essai. Il constitue l'opinion de l'analyste et
il ne doit pas être considéré comme preuve juridique sans l'approbation de CET ET

Certaines prestations rapportées dans ce document ne sont pas couvertes par l'accréditation. Elles sont identifiées par le symbole (*)



مركز تونس الدولي لتكنولوجيا البيئة
CENTRE INTERNATIONAL DES TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT DE TUNIS

Boulevard du Leader Yasser ARAFAT 1080, La Charguia, Tunis
Tel. : 71 206482 / 71 206486 - Fax. : 71 206642
Site web : <http://www.citet.nat.tn> - E-mail : bcc@citet.nat.tn



مركز تونس الدولي لتكنولوجيا البيئة
CENTRE INTERNATIONAL DES TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT DE TUNIS

Boulevard du Leader Yasser ARAFAT 1080, La Charguia, Tunis
Tel. : 71 206482 / 71 206486 - Fax. : 71 206642
Site web : <http://www.citet.nat.tn> - E-mail : bcc@citet.nat.tn



Page 1 / 2

RAPPORT D'ESSAIS

Identification : 01/AB4/13

Date de réception : 13/09/13

1- DEMANDEUR

Mme Khalléf Sakina

2- DESCRIPTION DE (s) L'OBJET (s) SOUMIS A L'ESSAI

Un échantillon de sédiment.

3- ESSAI (s) DEMANDE (s)

pH, Conductivité, Salinité, Calcium, Magnésium, Sodium, Potassium, Carbonate de Calcium, Sulfate, Chlorure, Nitrate.

4- METHODES D'ANALYSES

ESSAIS	METHODES	REFERENCES
p H	Electrochimie	NF T 90-008 (2001)
Conductivité, Salinité	Electrochimie	NF EN 27 - 888 (1994)
Calcium, Magnésium, Sodium, Potassium	Minéralisation	
	Emission Atomique-ICP	ISO 11885 (2007)
Sulfate, Chlorure, Nitrate	Extraction selon la méthode 1/5 (10g dans 50ml d'eau)	-
	Chromatographie ionique	ISO 10304-1 (2007)
Carbonate	Méthode par calcimètre de Bernard	-

5- RESULTATS:

Essai	Unité	Date d'exécution	AB4
p H	-	25/09/13	8,00 à 25,7C°
Conductivité	mS/m	25/09/13	3,95 10 ³
Salinité	‰	25/09/13	25,2
Calcium	g/kg MS	25/09/13	130
Magnésium	g/kg MS	25/09/13	20,2
Sodium	g/kg MS	25/09/13	48,6

Ce rapport d'essai ne concerne que les objets soumis à l'essai. Il constitue l'appareil et le matériel.

Il ne doit pas être reproduit sans autorisation écrite de l'organisme de C.T.E.T.

Certaines prestations suggérées dans ce document ne sont pas couvertes par l'accréditation. Elles sont identifiées par le symbole (*).

Page 2 / 2

RAPPORT D'ESSAIS

Identification : 01/AB4/13

Date de réception : 13/09/13

Potassium	g/kg MS	25/09/13	1,51
Essai	Unité	Date d'exécution	AB4
Sulfate	g/kgMS	01/10/13	42,3
Chlorure	g/kgMS	01/10/13	66,6
Nitrate	mg/kgMS	01/10/13	13,9
Carbonate	g/kgMS	30/09/13	97,8

Edité, le 02/10/13

Ce rapport d'essai ne concerne que les objets soumis à l'essai. Il constitue l'appareil et le matériel.

Il ne doit pas être reproduit sans autorisation écrite de l'organisme de C.T.E.T.

Certaines prestations suggérées dans ce document ne sont pas couvertes par l'accréditation. Elles sont identifiées par le symbole (*).

Site 1 : Oum Eraneb- flore isolée des saumures

Site 1	Souche orange						Souche beige					
Moyenne (x10 ²) /ml	Jan	Fev	Mar	Avr	Mai	Juin	Jan	Fev	Mars	Avr	Mai	Juin
O.Eraneb	32	43,75	45	57,25	62,5	65,5	24	34	32,75	44	52,5	58,75

Site 1 : Flore isolée des sédiments

Site 1	Souche rouge						Souche beige					
Moyenne (x10 ³) /g	Jan	Fev	Mar	Avr	Mai	Juin	Jan	Fev	Mars	Avr	Mai	Juin
O.Eraneb	29,5	42,75	36,5	58,75	69,25	75,25	31	42,5	45	54,25	62,5	65,5

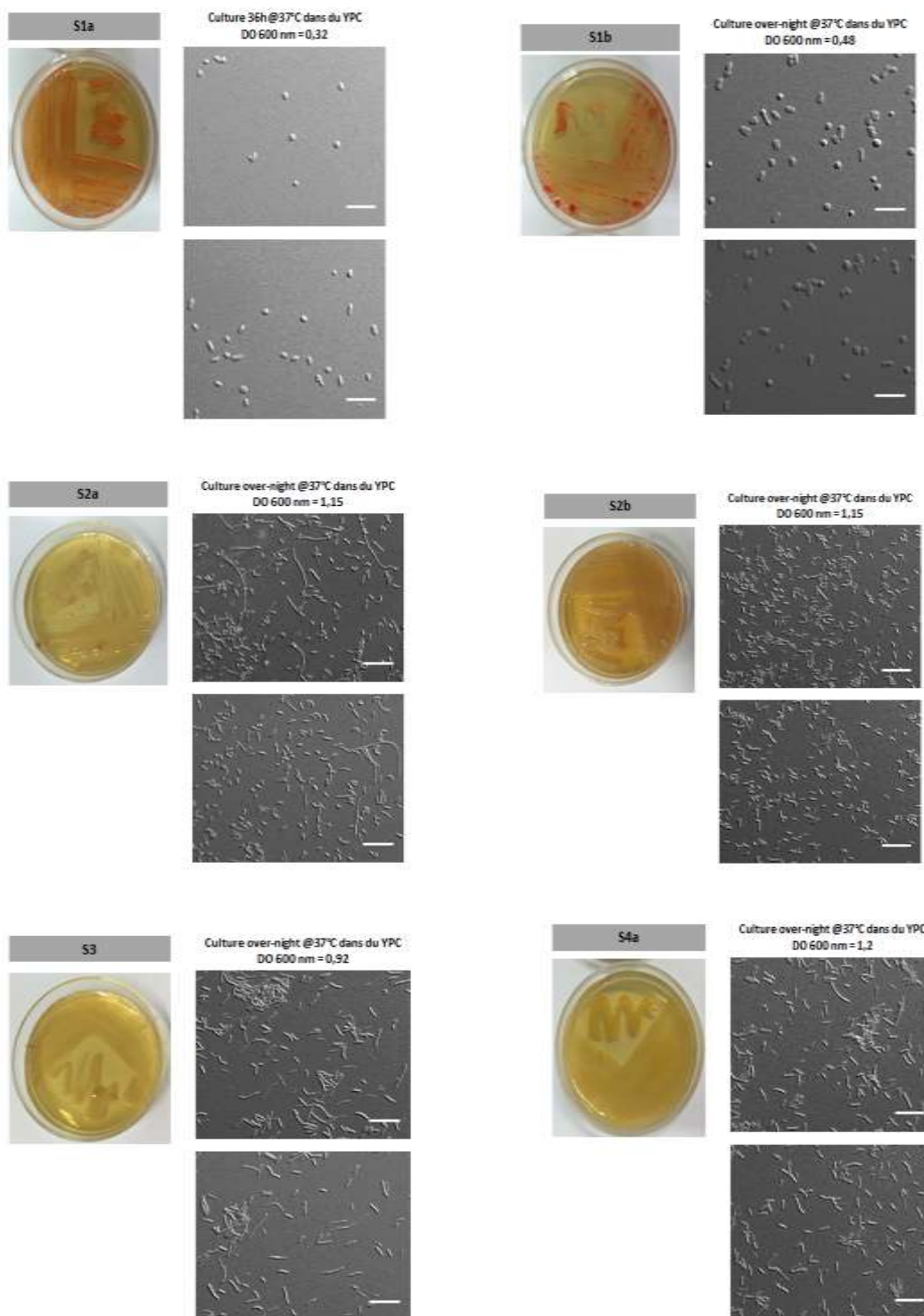
Site 2 : Ain El Beida- flore isolée des saumures

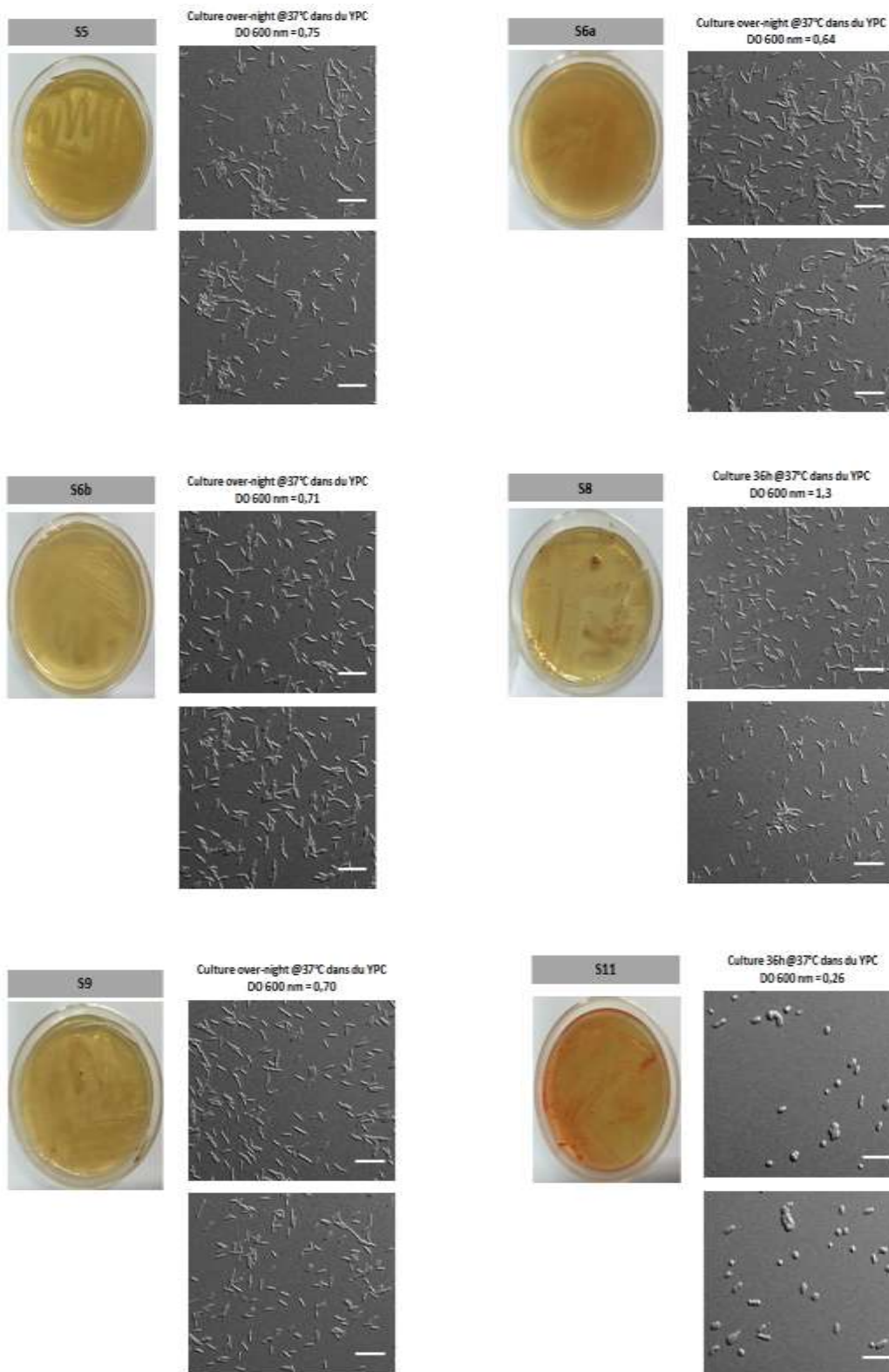
Site 2	Souche orange						Souche beige					
Moyenne (x10 ²) /ml	Jan	Fev	Mar	Avr	Mai	Juin	Jan	Fev	Mars	Avr	Mai	Juin
A.El Beida	66,25	74,75	77	89,75	109	123,25	37	43	49,75	57,25	66	71

Site 2 : Flore isolée des sédiments

Site 2	Souche rouge						Souche beige					
Moyenne (x10 ³) /g	Jan	Fev	Mar	Avr	Mai	Juin	Jan	Fev	Mars	Avr	Mai	Juin
A.El Beida	49,25	60	65,25	76,25	90,75	106,25	60	78	80	97	102	105

Annexe 5 : Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats





Annexe 6 : Croissance des isolats à différentes températures

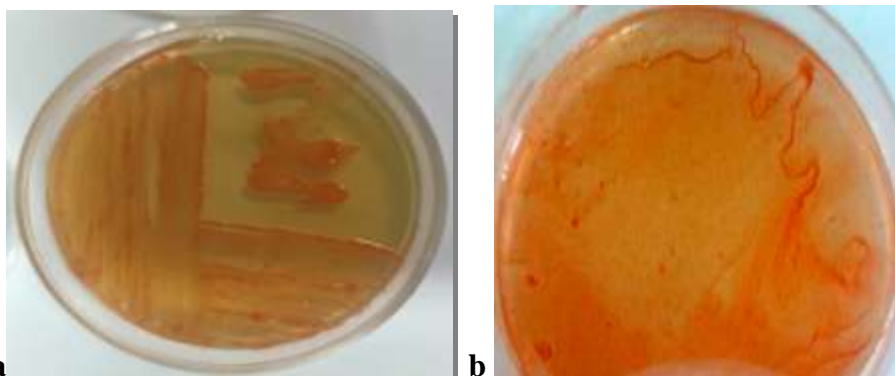
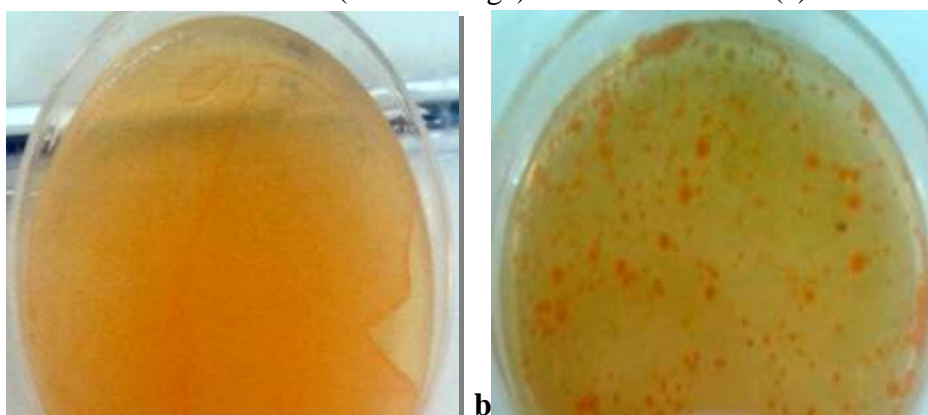
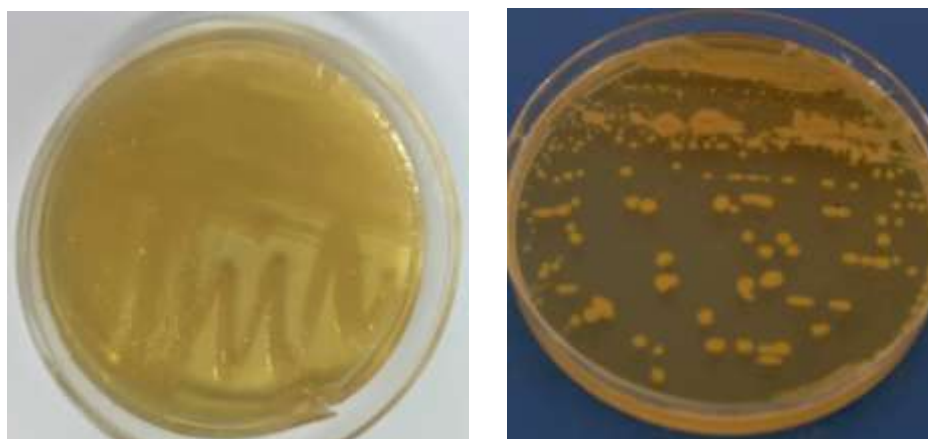
Souche *Halorrobrium litoreum* (souche rouge) croissance à 37°C (a) et à 40°C (b).Souche *Natronorubrum bengense* (souche orange) croissance à 37°C (a) et à 40°C (b).Souche *Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5 croissance à 37°C

Figure 38: Aspects des cultures à différentes températures d'incubation

Annexe 7 : Croissance des isolats à différentes concentrations de NaCl

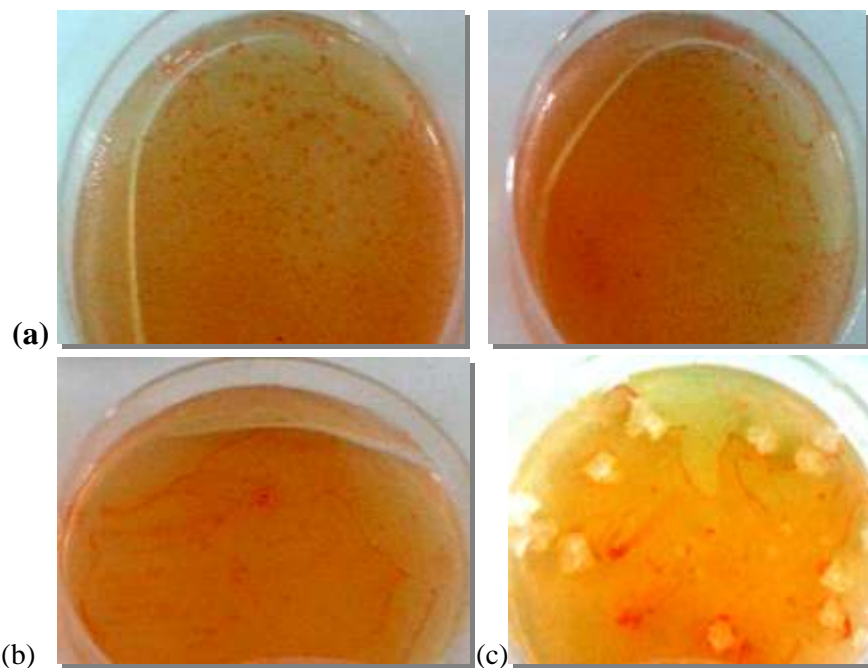
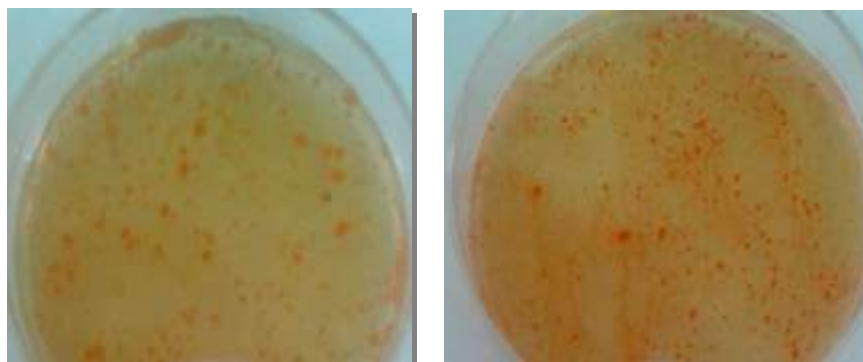
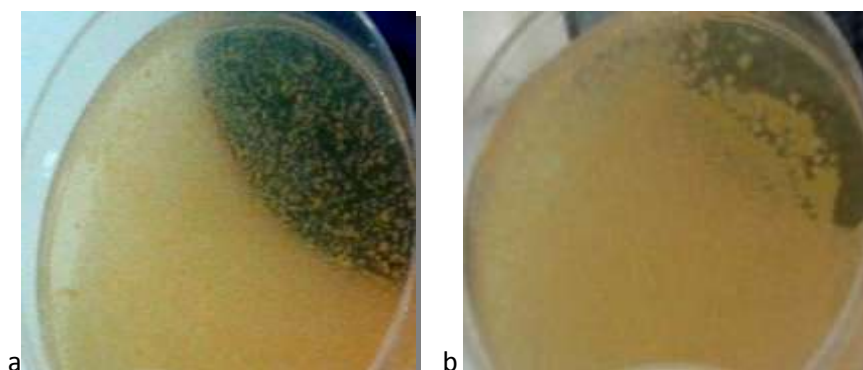
Souche *Halorrobrium litoreum* à 20% (a), 30% (b) et 35% (c) (p/v) de NaClSouche *Natronorubrum bengense* à 10% (p/v) de NaClSouche *Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5 à 10 (a) et 15% (p/v) de NaCl

Figure 39: Croissance des isolats sur milieux de culture à différentes teneur en sel

Annexe 8 : Le pH de croissance des différents isolats



(a)



(b)

Souche *Halorrobrium litoreum* à pH 7.5(a) et 9 (b)

(a)



(b)

Souche *Natronorubrum bengense* à pH 6.5 (a), 7.5 (b) et 9 (c)

Figure 40 : Croissance des isolats sur des milieux à différents pH

Annexe 9 : Séquençage demarche

Tableau 18 : Amorces utilisées et produits de PCR obtenus avec les différentes souches (LOB).

Souche	ADNg (ng.µl)	Amorces utilisées (T°C hybridation 55°C)	Produit PCR ARN16S purifié (ng.µl)
S1a	87,7	21F + 1404R (Archées)	24,8
S1b	48,2	21F + 1404R (Archées)	23,5
S2a	2,3	27F + 1492R (Bactéries)	12,5
S2b	3,1	27F + 1492R (Bactéries)	9,8
S3	6,5	27F + 1492R (Bactéries)	17,3
S4a	11,1	27F + 1492R (Bactéries)	14,2
S4b	5,0	27F + 1492R (Bactéries)	26
S5	4,1	27F + 1492R (Bactéries)	24,6
S6a	11,9	27F + 1492R (Bactéries)	26,0
S6b	3,0	27F + 1492R (Bactéries)	21,8
S7	28,4	27F + 1492R (Bactéries)	19,6
S8	37,7	27F + 1492R (Bactéries)	20,4
S9	6,2	27F + 1492R (Bactéries)	18,8
S11	154,6	21F + 1404R (Archées)	18,3

Annexe 10 : Séquences des isolats

Séquences de l'ADN 16S du S1a *Natronorubrum bangense*

> S1a_21F

TAGCATGCTAGTTGTACGAGTTTGTACTCGTAGCAGATAGCTC
 AGTAACACGTGGCCAAACTACCCTATGGATCCGGATACCCTCGGGAAACTGAGACTAATC
 CGGAATACGATTCCCACGCTGGAAGTGCAGGGAATCAGAAAACGCTCCGGCGCCATAGGAT
 GTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCCACCGTGCCAATAATCGGTAC
 GGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCCGGAGACGGTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGG
 CGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTACTGCACGCCAGTGCGATAAGGGGACTCCGAGTGCGA
 GGGCATATAGTCTCGCTTTTTGTAAACCGTAGGAAGGTTACAGAATAAGTGCTGGGCAAG
 ACCGGTGCCAGCCGCGCGGTAATACCGGCAGCACGAGTGATGACCGCTATTATTGGGCC
 TAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCTATCGGGAAATCCGCACGCCTAACGTGCGGG
 CGTCCGGTGGAAACTGCACGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCTGGGGTAGG
 AGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGGTAGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGAT
 CCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTCACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAG
 CTGTAAACGATGTCTGCTAGGTGTGTCACAACTACGAGTTTGTGATGTGCCGTAGGGAA
 GCCGTGAAGCAGACCGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCG
 GGGGAGCACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCAC
 CAGCATCGACAATGTGC

Séquences de l'ADN 16S du S2a *Alkalibacillus haloalkaliphilus C-5*

> S2a_27F

AAGTCGAGCGCGGGAAGCGAGCTGAAGCCCTTCGGG
 GTGGACGCTCGTGAACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTGTGA
 GACGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACGCATCGAACCGCATGGTT
 CGATGATCAAAGATGGCTTCTTGCTATCACTCACAGATGGGCCCGCGGCATTAGTTAG
 TTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
 CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCATCCG
 CAATGGACGCAAGTCTGACGGTGCAACGCCGCGTGAGCGATGAAGGTCTTCGGATCGTAA
 AGCTCTGTTGTGAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCT
 CACCAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCG
 TTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTTCCCTAAGTCTGATGTGAAAG
 GCCACAGCTCAACTGTGGAGGGCCATTGAAACTGGGGAACCTGAGGACAGAAGAGGAGA
 GCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCGTAGGCGAAG
 GCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTA
 GATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGTCCAACCTT
 AGTGCTGCAGTTAACGCAATAAGCACTCCGCCT

Séquences de l'ADN 16S du S11 *Halorubrum litoreum*

> S11_1404R

CCGCGATTACTACCGAATCCAGCTTCATGTGGGCGAGTTGCAGC
 CCACAATCCGAACTACGATCGAGTTTCTGAGATTACCGTCTCCTTTCGGAGTTGGAACCC
 TTTGTCTCGACCATTTAGTCCCGGTGTTGCCAGCACATTCGGGGCATACTGACCTACC
 GTTGCCCGTTCCTTCCCTCCGTGTTAGCCACGGCGGTCCCCCTACTGTCCCCAGCTACCTC
 GCGGTAAGTGTGGCAAGTAAGGGTGCAGGCTCGCTCGTTGCCTGACTTAACAGGACGCC
 TCACGGTACGAGCTGACGGCGGCCATGCACCTCCTCTGAGGCTCGGATAAGGTCATCA
 ACCTGATCGTCAATTACCACAGTCGATGCTGGTGTAGATGTCCGGCGTTGAGTCCAATTA
 CCGCAGGCTCCTCCGTTGTAGTGTCCCCCGCCAATTCCTTTAAGTTTCATCCTTGGCGG
 ACGTACTTCCCAGGCGGCTGCTTAGCGGCTTCCCTACGGCACAGCACCCACTCGTAGTG
 GGAGCCACACCTAGCAGGCAATTGTTTACGGCCAGGACTACCCGGGTATCTAATCCGGTTC
 GAGACCCTGGCTTTCGTCCCTCACTGTCGGATCCGTCCCTCGCGACGTGCTTTCGCCATCG

GCGGTCCGTCCAGGATTACGGGATTTCACTCCTACCCCGGACGTACCCGTCGCGCCTTCC
GGTCCCAAGCCACGCAGTTTCTACCGGGCGCCACCTGTTGAGCAGGTGGATTTCCCGAT
GGACTTGCGCGGCCAGCTACGGACGCTTTAGGCCAATAAGATCGGCCATCACTTGGGCT
GCCGGTATTACCGCGGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCAGCCCTTATTCTGGTACCACCTT
ACGGTACCGAAAAGCACAGGCGCTATGCCTGTGCACTTGGGATCCCCCTATCGCACTGTC
G

Annexe 11 : Effets des antibiotiques sur les souches isolées



*1



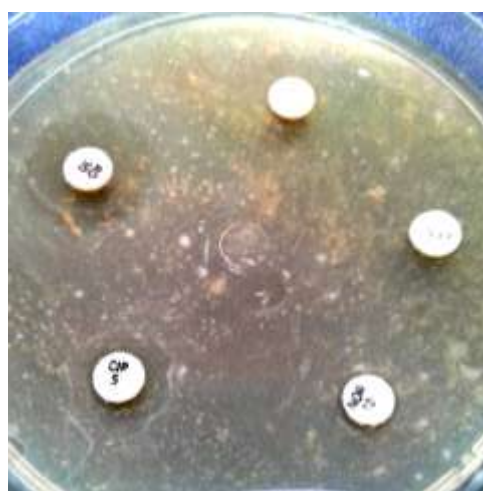
*2

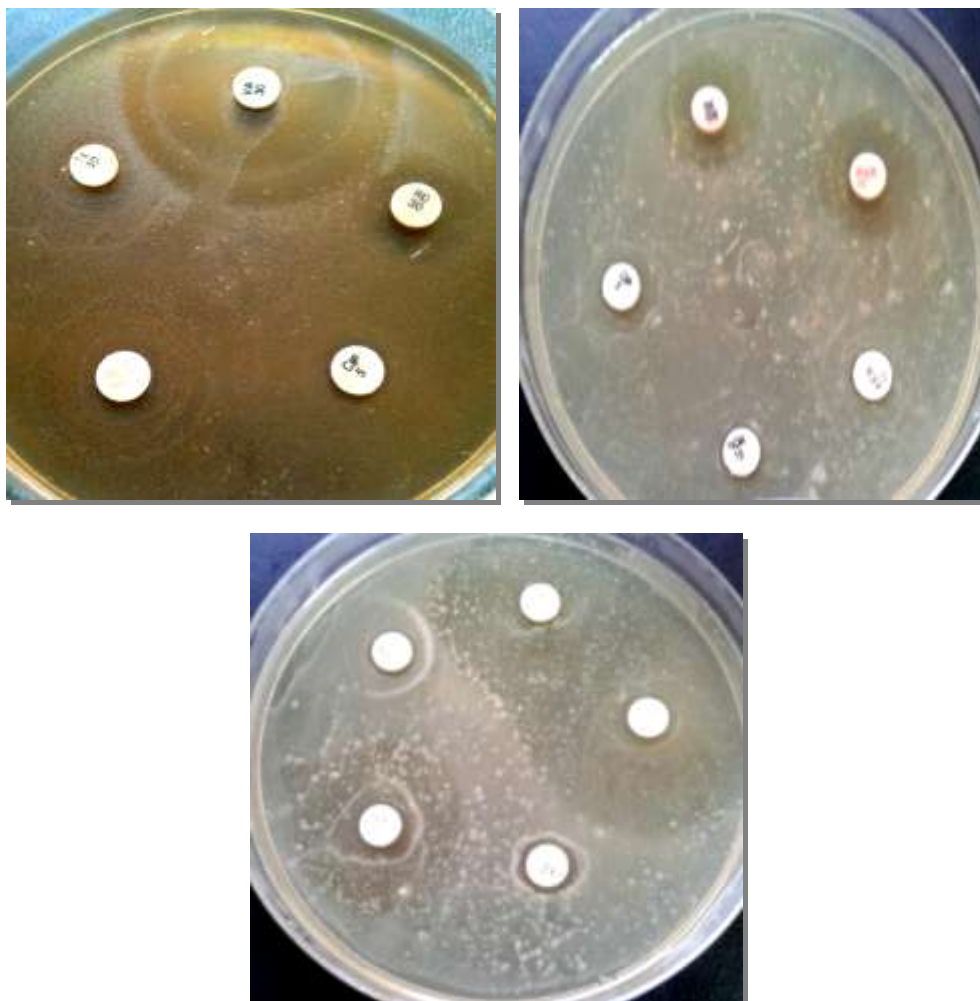
Halorubrum litoreum *1

Natronorubrum bangense *2



*3

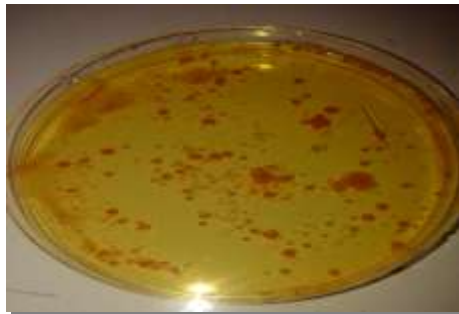




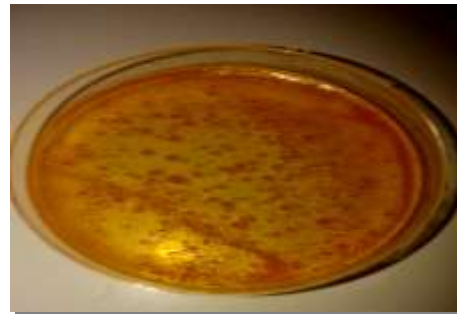
Souche *Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5

Figure 41: Résultats de l'antibiogramme des souches isolées

Annexe 12 : Croissance à différentes concentrations de Mg^{2+}



[0% Mg^{2+}]



[0.6% Mg^{2+}]



[1.2% Mg^{2+}]



[3% Mg^{2+}]

souche *Natronorubrum bengense*



[0.6% Mg^{2+}]



[2.4% Mg^{2+}]



[3% Mg^{2+}]

souche *Halorubrum litoreum*



[0% Mg²⁺]



[2.4% Mg²⁺]



[3% Mg²⁺]

souche *Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5

Figure 42: Aspects des cultures sur milieux à différentes concentrations de Mg²⁺