

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل-

Université Mohammed Seddik BenYahia-Jijel-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie Appliquée

et Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية

و العلوم الغذائية

## Mémoire de fin d'études

Envue de l'obtention du diplôme: **Master Académique en Biologie**

**Option** : Microbiologie Appliquée

### Thème

**Screening d'hydrolases extracellulaires chez des bactéries  
halotolérantes isolées d'anchois salés et séchés**

#### Membres de jury :

**Présidente** : Dr BEKKA-HADJI F.

**Examinatrice** : Dr BENALI S.

**Encadrante**: M<sup>lle</sup>AYAD R.

#### Présenté par :

ABDELATIF Soumia

BOUMAZA Loubna

**Année Universitaire: 2018-2019**

**Numéro d'ordre (bibliothèque) :**

## *Remerciements*

*Avant toute chose,*

*Nous remercions « Allah » qui nous a donné la force et la volonté pour terminer ce travail.*

*Nous tenons à exprimer nos profondes gratitudees à notre encadreur M<sup>lle</sup> AYAD.R, pour ses encouragements et ses conseils, qui ont contribué à notre formation et qui nous ont permis de mener à bien ce travail.*

*Nous exprimons notre gratitude aux membres du jury : Dr BEKKA-HADJI.F et Dr BENALI. S qui ont évalué ce travail.*

*Nous n'oublions pas à exprimer chaleureusement nos remerciements à tous nos enseignants en particulier Mr KHENOUF .T et M<sup>me</sup> OULED HADDAR .H, tous les techniciens du Laboratoire de microbiologie surtout BOUFANCHOUCHA. B .*

*A nos proches amies Fati, Sara et Nawel pour l'aide et la disponibilité à chaque moment.*

## *Dédicace*

*« Loubna »*

*Je dédie ce travail : A mes très chers parents qui m'ont tout donné sans rien en retour et que j'aime plus que tous au monde et auxquels je dois toute ma vie et toutes mes réussites si j'en suis arrivée là, c'est grâce à vous ; vous m'avez toujours poussée, motivée, encouragée et soutenue dans mes choix, Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon Instruction et mon bien être.*

*A mes adorables sœurs, qui ont toujours été mon soutien : Manel, Asma et ma belle Samar.*

*A mes chers frères Zaki, Yahia et Sifo qui ont montré une totale disponibilité à chaque sollicitation. Un merci spécial à mon frère Loukman je n'oublierai jamais votre soutien.*

*A ma belle collègue Souma, pour sa collaboration efficace.*

*A tous les membres de ma famille, petits et grands et tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.*

## *Dédicace*

*« Soumia »*

*Je dédie ce travail:*

*A celle qui je ne trouve pas les mots pour m'exprimer : La seule qui n'a jamais cessé ses efforts, son aide, son soutien pour que j'atteigne ce niveau. Ta présence seulement m'enforcie ma chère maman*

*A celui qui m'a montré la patience, l'encouragement et qui a été toujours avec moi avec sa chaleur paternelle.*

*A mes frères "Aymen , Koussay et Zidané" , A mes sœurs" Amina, Besma ,Khadidja ,Loubna et Nafissa avec leur petit fille, mon cœur et mon âme abir.*

*Ma belle amie Loubna qui a fourni, beaucoup de plaisir et beaucoup de bons souvenirs au cours des trois dernières années.*

## *Sommaire*

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
<b>Introduction</b> .....	<b>01</b>
<b>Synthèse bibliographique</b>	
<b>I. Microflore halophile d'anchoitage</b>	
I.1. Notion de petits pélagiques.....	02
I.1.1. Anchois .....	02
I.2. Technologie des semi-conserves d'anchois salés.....	03
I.3. Microbiologie de l'anchoitage.....	03
I.3.1. Microflore halophile.....	04
I.3.1.1. Définition des halophiles.....	04
I.3.1.2. Caractères généraux.....	04
I.3.1.3. Adaptation aux milieux salés.....	05
<b>II. Biotechnologie des halotolérants</b>	
II.1. Enzymes Extracellulaires.....	07
II.1.1. Amylases.....	07
II.1.2. Pectinases.....	08
II.1.3. Protéases.....	08
II.1.4. Lipases, estérases et lécithinases .....	09
<b>Matériel et méthodes</b>	
1. Revivification des isolats.....	10
2. Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies.....	10
2.1. Examen macroscopique.....	10
2.2. Examen microscopique.....	10
2.2.1. Coloration de Gram.....	10
3. Caractérisation physiologique des isolats.....	11
3.1. Salinité.....	11
3.2. pH.....	11
3.3. Température.....	11
4. Caractérisation biochimique des isolats.....	11

4.1. Mise en évidence de la catalase.....	11
4.2. Recherche de la $\beta$ -galactosidase.....	11
4.3. Recherche du nitrate réductase.....	12
4.4. Recherche de l'uréase.....	12
4.5. Recherche de la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et l'arginine dihydrolase...	12
4.6. Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons.....	12
4.7. Croissance sur le milieu Triple SugarIron (TSI).....	13
4.8. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité.....	13
4.9. Production d'indole.....	13
4.10. Réactions de VogesProskauer (VP) et au Rouge de Méthyle (RM).....	13
4.11. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires.....	14
4.11.1. Détermination de l'activité amylolytique.....	14
4.11.2. Détermination de l'activité de pectinolytique.....	14
4.11.3. Détermination de l'activité protéolytique.....	15
4.11.4. Détermination de l'activité lipolytique.....	15

### **Résultats et discussion**

1.Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies.....	16
2.Caractérisation physiologique des isolats.....	17
2.1. Salinité.....	17
2.2.pH.....	17
2.3. Température.....	17
3.Caractérisation biochimique des isolats.....	18
3.1. Mise en évidence de la catalase.....	18
3.2. Recherche de la $\beta$ -galactosidase.....	18
3.3. Recherche du nitrate réductase.....	18
3.4. Recherche de l'uréase.....	19
3.5. Recherche de la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et l'arginine dihydrolase...	19
3.6. Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons.....	19
3.7. Croissance sur le milieu Triple Sugar Iron (TSI).....	19
3.8. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité.....	19
3.9. Production d'indole.....	19
3.10. Réactions de Voges Proskauer (VP) et au Rouge de Méthyle (RM).....	19
3.11. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires.....	19

4. Discussion.....	23
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>25</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>26</b>
<b>Annexe</b>	
<b>Résumés</b>	

## *Liste des abréviations*

ADH: Arginine Dihydrolase.

KCl: Chlorure de potassium.

kDa : Kilodalton.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Dihydrogénophosphate de potassium

LDC: Lysine Décarboxylase.

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O : Sulfate de magnésium heptahydrate.

NaCl: Chlorure de sodium.

NaOH: Hydroxyde de sodium.

ODC: Ornithine Décarboxylase.



## *Liste des figures*

<b>Figure 1.</b> Résultats d'observations microscopiques après la coloration de Gram (G×100 à immersion).	<b>16</b>
<b>Figure 2.</b> Exemples d'activités hydrolytiques extracellulaires	<b>20</b>
<b>Figure 3.</b> Nombre d'activités enzymatiques pour chaque isolat	<b>21</b>

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1.</b> Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies.	<b>16</b>
<b>Tableau 1.</b> Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies (suite).	<b>17</b>
<b>Tableau 2.</b> Caractérisation physiologique des isolats (salinité, température et pH).	<b>18</b>
<b>Tableau 3.</b> Caractérisation biochimique des isolats.	<b>22</b>
<b>Tableau 4.</b> Milieux de culture utilisés pour la caractérisation biochimique (Annexe).	

# *Introduction*

---

Depuis longtemps, le salage et le séchage sont utilisés comme méthode de conservation du poisson. La production des poissons salés en conserve est une activité traditionnelle de l'industrie de pêche dans les pays Méditerranéens (**Rajan et al., 2010**). Parmi ces poissons, on cite, l'anchois salé (*Engraulis encrasicolus*).

Le chlorure de sodium est un ingrédient essentiel du processus de maturation de l'anchois, contribuant non seulement à la saveur et à la texture de ce type de produit, mais également à la stabilité microbiologique (**Llorente Holgado et al., 2007**). La forte teneur en sel et la faible teneur en humidité des poissons salés ont contribué à la prolifération des bactéries halophiles (**Rajan et al., 2010**). Ces dernières ont un métabolisme cellulaire aux caractéristiques spéciales (**Delgado-Garcia et al., 2012**).

L'une des applications commerciales de ces microorganismes est la production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires (**Babavalian et al., 2013**). Ils sont devenus de plus en plus importants en tant que producteurs d'enzymes industrielles. La polyextrémophilie de ces enzymes leur permet d'être considérées comme une nouvelle alternative et peut même ouvrir de nouvelles possibilités d'application. Les halophiles et les halotolérants ont fourni une vaste gamme de nouvelles enzymes au cours des dernières années (**Mathabatha, 2010**).

Différents programmes de criblage ont été réalisés dans des habitats salins afin d'isoler et de caractériser de nouvelles activités enzymatiques ayant des propriétés différentes de celles des enzymes classiques (**De Lourdes Moreno et al., 2013**).

Afin d'enrichir nos connaissances sur la microbiologie d'un poisson très consommé «l'anchois», nous avons décidé d'entreprendre ce travail qui a pour objectif principal de mettre en évidence la présence d'enzymes hydrolytiques extracellulaires à intérêt biotechnologique.

La première partie du travail est consacrée à la description des données bibliographiques relatives à des généralités sur l'anchois, des notions sur les microorganismes halotolérants et halophiles, et enfin le potentiel biotechnologique des enzymes isolées de ce type de microorganismes en particulier les bactéries halotolérantes. La seconde partie se focalisera sur les techniques utilisées. Les résultats obtenus sont comparés et discutés.

# *Synthèse bibliographique*

---

*I. Microflore halophile  
d'anchoitage*

---

## I.1. Notion de petits pélagiques

Le groupe des petits pélagiques est constitué par l'ensemble des poissons de petite taille qui passent la plus grande partie sinon la quasi-totalité de leur phase adulte en surface ou en pleine eau. Ces espèces sont totalement libres à l'égard du fond et sont indépendantes de la nature du substrat (**Collignon, 1991**).

Les poissons pélagiques, poissons vivant en pleine mer entre 0 et 200 mètres et caractérisés par des migrations horizontale et verticale importantes dans les eaux côtières, constituent la plus grande part des captures marines mondiales. Ils représentaient 26% des captures mondiales totales en 2002 soit 22,5 millions de tonnes (**Fréon et al., 2005**). Parmi lesquels :

### I.1.1. Anchois

La famille des *Engraulidés* (anchois) comprend un seul genre (*Engraulis*) et sept espèces de petits poissons pélagiques. Ces poissons se rencontrent dans la mer Méditerranéenne, l'océan Atlantique, l'océan Pacifique et l'océan Indien. Plusieurs espèces de la famille des *Engraulidés* présentent un intérêt commercial. Les trois espèces principales sont *Engraulis ringens* (anchoveta), *Engraulis japonicus* (anchois japonais) et *Engraulis encrasicolus* (anchois européen). D'autres espèces importantes sont: *Engraulis anchoita* (anchois argentin) *Engraulis capensis* (anchois d'Afrique du Sud), *Cetengraulis mysticetus* (anchoveta du Pacifique) et *Engraulis mordax* (anchois californien) (**Ababouch et El Marrakchi, 2009**).

L'anchois *Engraulis encrasicolus* européenne est le plus important des ressources des poissons pélagiques dans la mer Méditerranée. Et comme dans le nord de cette mer, l'anchois et la sardine (*Sardina pilchardus*) sont les plus importantes de petits poissons pélagiques en termes de la biomasse et de l'intérêt commercial le long de la côte Algérienne (**Bacha et Amara, 2012**).

La destination majeure de ce petit animal pélagique est la transformation en semi-conserves d'anchois salés ou marinés. La quasi-totalité de cette production est exportée vers les pays de l'Union Européenne et les Etats Unis d'Amérique, ce qui lui confère une place importante dans l'économie nationale (**Castano, 1990**).

La plupart des anchois sont marines, mais certains peuvent tolérer des salinités. Son affinité pour les eaux légèrement dessalées lui fait apparaître régulièrement dans les panaches des fleuves ou les lagunes d'eaux saumâtres. En été, il a tendance à se déplacer vers le nord et

dans les eaux de surface, alors qu'en hiver il se retire vers le sud et descend vers le fond (Nizinski et Munroe, 1999; Coiffec, 2006; Woillez, 2007).

## **I.2. Technologie des semi-conserves d'anchois salés**

La technologie des semi-conserves d'anchois fait appel à l'action du sel seul sans intervention ni de traitement thermique ni d'adjonctions d'additifs en vue d'un effet stabilisateur pour la conservation. Le salage approprié de l'anchois conduit à une maturation caractéristique de la chair, le poisson est dit «*anchoité*». L'anchoitage est un processus complexe de réactions biochimiques qui dépendent de différents paramètres techniques (température, durée, pression, etc.) de la maturation.

Le salage des anchois peut être divisé en deux étapes : La première étape, comprend la diffusion du sel dans le poisson et l'élimination de l'eau. Les sels qui augmentent la solubilité des protéines ont également tendance à les dénaturer. La deuxième, plus lente, mûrit, ce qui implique une série de processus biochimiques complexes qui peuvent être regroupés de manière large dans la protéolyse, la lipolyse et l'oxydation des lipides. Les modifications physique et chimique intervenant au cours de la maturation déterminent les qualités sensorielles globales de l'anchois salé (Hernandez-herrero et al., 2002).

Dans cette technologie, la qualité de la matière première et des ingrédients conditionne la réussite de l'anchoitage et, par conséquent, l'obtention d'un produit final aux caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques désirées. Le choix de la matière première est donc une étape primordiale (Ababouch et El Marrakchi, 2009).

## **I.3. Microbiologie de l'anchoitage**

La présence d'une forte teneur en sel empêche la prolifération de la plupart des bactéries, notamment celles responsables de l'altération rapide du poisson, toutefois, certaines enzymes et des bactéries halophiles ou halotolérantes, peuvent rester plus ou moins actives et entraîner une lente dégradation des tissus avec production de substances qui confèrent des caractères organoleptiques propres à chaque produit. C'est le phénomène de maturation: Dans le cas de l'anchois, cette maturation se traduit par l'apparition d'une couleur rouge-brune de la chair et par une odeur et une saveur bien caractéristiques. Le phénomène est d'ailleurs appelé « Anchoitage » (Cosnard et al., 1983).

### **I.3.1. Microflore halophile**

Les bactéries halophiles sont des bactéries qui ne peuvent croître qu'en présence de sel généralement sous forme de chlorure de sodium (NaCl). La majorité des halophiles habitent le milieu marin où la concentration est voisine de 3,5 % en sel. Il existe cependant des habitats plus spécifiques et plus localisés tels que les marais salants ou les lacs salés colonisés par les microorganismes hyper-halophiles (**Kamekura, 1998**).

#### **I.3.1. 1. Définition des halophiles**

Les microorganismes halophiles comprennent un groupe hétérogène de microorganismes qui nécessitent une concentration élevée en sel pour leur croissance contrairement aux bactéries halotolérantes qui ne nécessitent pas de sel absolu pour la croissance. Ils ont été isolés de divers environnements salins, allant de saumures naturelles, les lacs de soude, la mer morte, les sources de carbonate, les sols alcalins et les aliments salés (**Patel et Saraf, 2015 ; Waditee-Sirisattha et al., 2016**).

La classification de Kushner (1978), définit différentes catégories de microorganismes halophiles sur la base de la concentration optimale en sel dans laquelle ils présentent une croissance optimale. Elle comprend quatre catégories: les organismes non halophiles sont définis comme ceux qui nécessitant moins de 1% de NaCl, alors ceux qu'ils peuvent tolérer des concentrations élevées de sel sont considérés comme des microorganismes halotolérants (**De Lourdes Moreno et al., 2013**).

En ce qui concerne les microorganismes halophiles, la classification distingue les halophiles légers (bactéries marines), qui se développent mieux dans les milieux contenant 1% à 3% de NaCl, les halophiles modérés, ceux se développant mieux dans les milieux contenant de 3% à 15% de NaCl, et les halophiles extrêmes montrant une croissance optimale dans les milieux contenant 15% à 30% de NaCl (**Kushner et Kamekura, 1988**).

#### **I.3.1.2. Caractères généraux**

Les halophiles constituent des espèces appartenant à différents genres possédant les caractéristiques suivantes: une croissance rapide, une faible demande nutritionnelle et une capacité d'utiliser une variété de composés comme seule source de carbone et d'énergie (**Babavalian et al., 2013**).



Ce type de microorganismes possède des caractéristiques spécifiques dans leurs structures cellulaires pour l'adaptation à la pression osmotique. Par exemple, la paroi cellulaire de certaines bactéries halophiles devient plus hydrophile en concentration élevée en sel que celle en basse salinité (**Mathabatha, 2010**), aussi il est bien établi que les protéines membranaires (et cytoplasmiques) des bactéries extrêmement halophiles ont une teneur élevée en acides aminés acides et généralement un excès important de résidus acides, par rapport aux protéines de non halophiles. Généralement, toutes les halobactéries présentent une très forte proportion de lipides chargés négativement à la surface de leur bicouche lipidique membranaire. Cela correspond à la proportion relativement élevée de résidus acides dans les protéines (**Russell, 1989**).

Les bactéries à Gram positif modérément halophiles ayant généralement une activité hydrolytique supérieure par rapport aux bactéries à Gram négatif (**Mathabatha, 2010**). L'une des applications commerciales de ces micro-organismes est la production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires qui sont actives et stables à des concentrations élevées en sel et dans des conditions difficiles avec des propriétés différentes de celles des enzymes classiques (**Babavalian et al., 2013**).

### I.3.1. 3. Adaptation aux milieux salés

Les microorganismes halophiles survivent dans concentrations élevées en sel car ils ont développé diverses modifications biochimiques, structurelles et physiologiques, permettant la synthèse catalytique de protéines dotées de propriétés physicochimiques et structurelles intéressantes (**Enache et Kamekura, 2010 ; Delgado-Garcia et al., 2012**).

Dans le monde microbien, les halophiles ont développé deux stratégies adaptatives différentes pour faire face à la pression osmotique induite par la forte concentration en NaCl des environnements normaux dans lesquels ils vivent, ce qui permet de maintenir la structure et la fonction des cellules (**Rohban et al., 2008**). Pour les halophiles, l'adaptation est représentée de façon génotypiques et phénotypique alors que les halotolérants s'adaptent seulement de façon phénotypique (**Russell, 1989**). Il existe deux stratégies fondamentales:

- **Accumulation de KCl**

Ce mécanisme d'adaptation est trouvé chez les bactéries anaérobies halophiles *Haloanaerobiales*. Il se déroule par l'accumulation d'ions inorganiques dans le cytoplasme, tels que les ions sodium, chlore et potassium. Elle permet l'équilibrage des sels lorsque

l'environnement est saturé de NaCl, évitant ainsi les chocs osmotiques dus aux fortes concentrations de sels. Il a également été constaté que, lorsque du sodium extracellulaire est présent, la cellule entre dans une phase stationnaire via un échange de potassium intracellulaire et de sodium extracellulaire pour cela ces organismes halophiles se développent de manière optimale en présence de salinités extrêmement élevées (**Delgado-Garcia et al., 2012 ; Patel et Saraf, 2015**).

- **Stratégie des solutés compatibles**

Une stratégie plus souple est trouvée dans les microorganismes halotolérants et les bactéries modérément halophiles qui se développent dans une large gamme de salinités (généralement 0,5 à 3 M de NaCl) et conservent leur viabilité dans ces environnements en accumulant des substances à activité osmotique de faible poids moléculaire, communément appelés solutés compatibles pour contrecarrer l'effet délétère de la salinité élevée sur la physiologie cellulaire et la perte d'eau dans les cellules (**Margesin et Schinner, 2001; Mathabatha, 2010**).

Les solutés compatibles principalement neutres mais polaires, très solubles dans l'eau et qui n'interfèrent pas avec le métabolisme cellulaire. Ils comprennent les polyols tels que le glycérol, les sucres et leurs dérivés, les acides aminés et leurs dérivés, et les amines quaternaires telles que la glycine, la bétaine et les ectoïnes, etc., soit par synthèse de novo, soit par absorption à partir de l'environnement. L'ectoïne est l'un des osmolytes les plus abondants dans la nature. Il peut protéger de nombreuses enzymes instables, ainsi que des acides nucléiques, contre l'action néfaste de la salinité élevée, de la dénaturation thermique, de la dessiccation, augmentant ainsi la durée de conservation et l'activité des préparations enzymatiques (**Mathabatha, 2010 ; Patel et Saraf, 2015**).

## *II. Biotechnologie des halotolérants*

---

## II.1. Enzymes Extracellulaires

Les hydrolases constituent une classe d'enzymes largement réparties dans la nature. Les enzymes microbiennes sont souvent plus utiles que les enzymes végétales et animales en raison de leur stabilité et leur production la plus pratique et plus sûre. Ces enzymes dérivées d'halophiles sont dotées des caractéristiques structurelles uniques et d'un pouvoir catalytique leur permettant de soutenir les processus métaboliques et physiologiques dans des conditions de salinité élevée (**Kumar et al., 2012 ; De Lourdes Moreno et al., 2013 ; Patil et Jadhav, 2017**).

Les enzymes halophiles représente une nouvelle alternative industrielle en raison de leur capacité à s'adapter aux conditions extrêmes de certains processus industriels, telles que les températures élevées, la large gamme de pH, les concentrations élevées en sel, la dénaturation par les solvants, etc. Ces caractéristiques préliminaires des hydrolases de microorganismes halophiles ont permis de leur donner le nom d'extremozymes (**Enache et Kamekura, 2010 ; Delgado-Garcia et al., 2012 ; Kumar et al., 2012**).

Ces enzymes remplissent la même fonction enzymatique que leurs homologues non halophiles, elles peuvent catalyser de telles réactions dans différentes conditions. La plupart des halophiles peuvent sécréter des enzymes hydrolytiques extracellulaires, telles que, les amylases, les protéases, les lipases, les pectinases, etc. (**Mathabatha, 2010 ; Yin et al., 2015, Waditee-Sirisattha et al., 2016**).

### II.1.1. Amylases

Les amylases ont un poids moléculaire compris entre 50 et 75 kDa, sont stables à une large gamme de pH et de salinité et peuvent fonctionner à des températures supérieures à 50°C.

La grande stabilité des amylases halophiles dans des conditions défavorables est souhaitable pour les applications industrielles, en particulier pour le traitement des eaux usées contenant beaucoup de sels et de résidus d'amidon (**Yin et al., 2015**). L'hydrolyse chimique de l'amidon a été remplacée par l'hydrolyse enzymatique, ce qui rend le processus plus facile et respectueux de l'environnement (**Suriya et al. 2016**). Ils sont largement utilisées dans l'industrie des aliments transformés telles que la cuisson, la préparation du café, de jus de fruits et de sirops d'amidon et aussi comme additif alimentaire (**Gopinath et al., 2017**). Les amylases sont le deuxième type d'enzymes utilisées dans la formulation des détergents

enzymatiques et dont leur utilisation améliore la capacité à éliminer les taches tenaces et à rendre le détergent sans danger pour l'environnement (Suriya et al., 2016).

Quelques  $\alpha$ -amylases ont été purifiées et caractérisées à partir de bactéries halotolérantes, telles que, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. stearothermophilus* (Suriya et al., 2016).

### II.1.2. Pectinases

Les pectinases sont produites naturellement par les plantes, les champignons filamenteux, les bactéries et les levures. Ce groupe comprend les enzymes qui agissent sur la pectine, entraînant sa dépolymérisation par l'hydrolyse (exo-polygalacturonase et endo-polygalacturonase) ou la trans-élimination (pectine lyase) et sa désestérification (pectine méthylestérase) par rupture de la liaison ester entre les groupes carboxyle et méthyle du polysaccharide (Fontana et Silveira, 2012). Les pectinases sont largement utilisées dans l'industrie textile pour le rouissage et le dégommage des fibres, récurage du coton, traitement des eaux usées pectiques, extraction de la fabrication du papier et clarification des jus de fruits, extraction de l'huile, fermentation du café et du thé. Ce type d'enzyme hydrolytique est produit par des bactéries halophiles et halotolérantes à une concentration saline de 10 à 23% de NaCl et à une température optimale de 40°C. Une pectinase extracellulaire active à un intervalle de pH compris entre (5-11), a été produite par *Bacillus subtilis* (Delgado-Garcia et al., 2012 ; Joshi et al., 2013).

### II.1.3. Protéases

Les protéases microbiennes comptent parmi les enzymes les plus étudiées et sont largement utilisées dans les processus industriels. Ils constituent l'un des groupes les plus importants d'enzymes industrielles et représentent près de 60% de la vente totale d'enzymes. Ces enzymes protéolytiques sont omniprésentes et se retrouvent dans tous les organismes vivants (Mathabatha, 2010; Patil et Jadhav, 2017).

Les protéases halophiles ont été isolées chez un grand nombre des bactéries, notamment *Bacillus* spp., *Halobacillus* spp., *Chromobacter* spp. et *Virgibacillus* spp. (Delgado-Garcia et al., 2012). Ces enzymes restent actives en présence de NaCl et sont tolérantes à un pH allant de 5 à 10 et à une température de 40 à 75°C (Yin et al., 2015). Plusieurs espèces de *Bacillus* sp. dominent le secteur industriel, à savoir, *Bacillus licheniformis*, *B. firmus*, *B. alcalophilus*,

*B. amyloliquefaciens*, *B. protéolyticus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. sterothermophilus* et *B. mojavensis* (Patil et Jadhav, 2017).

La souche *Bacillus megaterium* est productrice de caséinase à partir des déchets agricoles et industriels (Ahmed et al., 2019).

La souche *Bacillus globisporus* produit une gélatinase après 24 heures, en utilisant la poudre de poisson dans le milieu. Elle est active à un pH compris entre (6-9), et à des températures comprises entre (35-65°C), elle a également montré une activité remarquable en présence d'ions métalliques (Pathak et Rathod, 2017).

#### II.1.4. Lipases, estérases et lécithinases

Les estérases et les lipases sont largement utilisées comme biocatalyseurs en raison de leur capacité à produire des composés optiquement purs (Dassarma et al., 2009). Ils représentent une famille d'enzymes à fort potentiel dans divers processus industriels, telles que l'hydrolyse stéréospécifique, la trans-estérification, la synthèse d'esters et d'autres réactions de biosynthèse organique (Enache et Kamekura, 2010). Les lipases sont des carboxyl-ester hydrolases du groupe de l'enzyme estérase, catalysent le clivage et la formation d'acylglycérols à longue chaîne. Ils sont principalement actifs contre les substrats insolubles dans l'eau, ainsi que les triglycérides composés d'acides gras à longue chaîne. Ces enzymes ayant la capacité à effectuer une biotransformation très spécifique dans les industries alimentaires, des détergents, du papier, des cosmétiques, de la synthèse organique, de l'agrochimie, des carburants et des produits pharmaceutiques, ainsi que dans le contrôle de la pollution. Ils sont adaptées au froid et ont un grand potentiel dans le domaine du traitement des eaux usées (Calimlioglu et Arga, 2014).

Plusieurs bactéries halotolérantes, telles que, *Bacillus halodurans*, *B. alcalophilus*, *B. licheniformis* et *Marinobacter lipolyticus* produisent des lipases ayant d'excellentes propriétés pouvant être utilisées dans l'industrie alimentaire (Calimlioglu et Arga, 2014).

Les bactéries productrices de lécithinase peuvent agir sur la lécithine et produire du phosphore et de la choline avec précipitation des graisses (Bharadwaj et Gopinath, 2016). L'activité de la lécithinase (phospholipolytique) est utilisée comme indicateur de toxicité alimentaire. Les souches, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* et *Bacillus thuringiensis* ont été caractérisées comme productrices de lécithinase (Sharaf et al., 2014).

# *Matériel et méthodes*

---

Ce travail est réalisé au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie à l'université de Jijel pendant 21 jours dont le but de caractériser des souches halotolérantes en vue d'une recherche d'enzymes hydrolytiques extracellulaires.

## 1. Revivification des isolats

Les souches ont été isolées, purifiées et conservées par M<sup>lle</sup> AYAD, l'année passée, d'un échantillon d'anchois (*Engraulis encrasicolus*) salés et séchés de la Wilaya de Jijel. Elles sont revivifiées dans le bouillon nutritif puis repiquées sur milieu solide composé d'extrait de levure 5g, peptone 5g, NaCl 10g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 6,2g, KCl 0,87g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,75g et agar-agar 22g et complété à 1000 ml avec de l'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à 7,2±0,2 à l'aide d'une solution de NaOH 4M.

## 2. Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies

### 2.1. Examen macroscopique

La morphologie des colonies est déterminée sur milieu solide. L'observation de leur aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. Les éléments d'identification macroscopiques sont :

- La forme des colonies ;
- La taille des colonies par la mesure du diamètre ;
- La pigmentation ;
- L'élévation ;
- L'opacité ;
- La surface.

### 2.2. Examen microscopique

#### 2.2.1. Coloration de Gram

La morphologie et l'arrangement cellulaire sont déterminés par la coloration de Gram (**Gram, 1884**), selon la technique suivante:

- Préparer et fixer un frottis bactérien à la chaleur du bec Bunsen.
- Recouvrir au violet de Gentiane pendant 1min. Eliminer l'excès par l'eau courante;
- Ajouter du Lugol pendant 1min, jeter l'excès par l'eau courante;
- Traiter à l'alcool 95° pendant 30 secondes, puis rinçage à l'eau;
- Recolorer à la Fuschine pendant 1 à 2 minutes, rinçage à l'eau puis séchage;



L'observation est effectuée à l'immersion à l'aide d'un microscope photonique. Les bactéries à Gram positifs se colorent en violet alors que celles à Gram négatifs se colorent en rose.

### **3. Caractérisation physiologique des isolats**

L'influence sur la croissance de la salinité, de la température et du pH est déterminée en variant un des paramètres alors que les deux autres sont maintenus constants.

#### **3.1. Salinité**

La croissance à différentes concentrations finales de sel (0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, p/v) est examinée à pH  $7,2 \pm 0,2$  (Kharroub, 2007).

#### **3.2. pH**

L'intervalle de pH de croissance a été déterminé par ensemencement des milieux gélosés sur une gamme s'étalant de 5,0 à 10,0.

#### **3.3. Température**

L'incubation des milieux solides à pH  $7,2 \pm 0,2$  ensemencés a lieu à 20; 30; 37; 40 et 60°C.

### **4. Caractérisation biochimique des isolats**

#### **4.1. Mise en évidence de la catalase**

La présence de la catalase est mise en évidence en dissociant à l'aide de l'effilure d'une pipette Pasteur une quantité suffisante de la culture sur une lame de verre contenant une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes. La présence d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles d'oxygène (Gerhardt et al., 1994).

#### **4.2. Recherche de la $\beta$ -galactosidase**

Des suspensions denses de culture sont préparées dans des solutions salines optimales correspondantes à chaque souche puis un disque imprégné d'Ortho-Nitro-Phényl- $\beta$ -Galactoside (ONPG) est ajouté à chaque suspension. Après incubation pendant 18 à 24 heures, l'apparition d'une coloration jaune indique l'hydrolyse de l'ONPG et en conséquence la présence de la  $\beta$ -galactosidase (Joffin et Leyral, 2006).

#### 4.3. Recherche du nitrate réductase

Ce test consiste à mettre en évidence la réduction des nitrates en nitrites par l'enzyme nitrate réductase. Les souches sont cultivées sur bouillon nitraté, après incubation à 30°C pendant 48 heures, trois gouttes de chacun des réactif NIT I et NIT II, appelés aussi réactifs de GRIESS, sont ajoutées à la culture (De Vos et al., 2009).

La réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge. En absence de cette coloration, quelques milligrammes de la poudre de zinc sont additionnés s'il y a :

- Apparition de la coloration rouge: les nitrates sont encore présents dans le milieu et sont réduits en nitrites par le zinc, donc la souche ne possède pas la nitrate réductase.
- Absence de coloration rouge : les nitrates sont réduits par les bactéries jusqu'au stade azote, donc la souche possède la nitrate réductase.

#### 4.4. Recherche de l'uréase

L'enzyme hydrolysant l'urée est recherchée sur le milieu synthétique à l'urée de Christensen. Les souches sont ensemencées sur gélose inclinée puis incubées. La réaction positive se traduit par une coloration rouge violacée ou orange foncée par contre une teinte jaune du milieu indique une réaction négative (Guiraud, 1998). Certaines bactéries possèdent une uréase très active, capable de former du CO<sub>2</sub> et de l'ammoniaque à partir de l'urée. Le CO<sub>2</sub> et le NH<sub>3</sub> se combinent pour former du carbonate d'ammonium, ce dernier alcalinise le milieu.

#### 4.5. Recherche de la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et l'arginine dihydrolase

Ces enzymes, dont l'action est favorisée en milieu acide, forment des substances alcalines à partir des acides aminés.

Les milieux utilisés ne contiennent qu'un seul acide aminé, lysine, ornithine ou arginine. Quatre tubes contenant le bouillon de Møller dont un est un témoin sont inoculés avec une suspension microbienne.

Après incubation, une réaction négative se traduit par une coloration jaune (acidification du milieu) alors que l'apparition d'une coloration violette (alcalinisation du milieu) révèle une réaction positive (Guiraud, 1998).

#### 4.6. Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons

La capacité des souches à assimiler le citrate comme unique source de carbone et d'énergie est testée sur un milieu synthétique au citrate de Simmons.

Après incubation, la croissance sur ce milieu s'accompagne généralement d'une alcalinisation provoquant le virage de couleur du vert au bleu vif (**Harley et Prescott, 2002**).

#### **4.7. Croissance sur le milieu Triple Sugar Iron (TSI)**

La gélose Triple Sugar Iron permet la mise en évidence de la fermentation du glucose (avec ou sans production de CO<sub>2</sub>), l'oxydation du lactose et/ou du saccharose et la production de sulfure d'hydrogène.

L'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu se traduit par une acidification, jaunissement du culot dans le cas de glucose et de la pente dans le cas du lactose et/ou du saccharose. La production de sulfure d'hydrogène à partir du thiosulfate est mise en évidence par la formation d'une coloration noire et le dégagement de CO<sub>2</sub> est révélé par l'apparition de bulles d'air dans le culot ou le décollement de la gélose (**Guiraud, 1998**).

#### **4.8. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité**

La mobilité bactérienne ainsi que la fermentation du mannitol sont étudiées en ensemençant le milieu semi-solide mannitol-mobilité par piqure centrale à l'aide d'un fil droit. La mobilité est révélée par un envahissement plus ou moins grand du milieu à partir de la piqure d'inoculation, l'utilisation du mannitol est traduite par un virage de la couleur du rouge au jaune (**Gerhardt et al., 1994**). Le mannitol est un produit dérivé du D-mannose. Sa dégradation est comparable à celle du glucose et conduit à la formation d'acides à chaînes très courtes comme l'acide acétique.

#### **4.9. Production d'indole**

Certaines bactéries désaminent puis hydrolysent le tryptophane pour donner une molécule d'indole. L'indole réagit avec la fonction aldéhyde du para-diméthyl-amino-benzaldéhyde pour donner un composé coloré en rouge.

L'ensemencement des souches est réalisé sur un milieu de culture liquide supplémenté de 0,5% (p/v) d'extrait de levure. Après incubation, la production d'indole est mise en évidence par l'ajout de quelques gouttes du réactif de Kovacs. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge à la surface (**Gonzalez et al., 1978**).

#### **4.10. Réactions de Voges Proskauer (VP) et au Rouge de Méthyle (RM)**

Le milieu de Clark et Lubs permet l'étude des produits de fermentation du glucose et la différenciation entre les fermentations « acides mixtes » et « butylène glycolique ».

Le test au rouge de méthyle permet la mise en évidence, grâce au rouge de méthyle, de la fermentation des acides mixtes par acidification d'un milieu glucosé après fermentation du glucose. Tandis que le test de Voges Proskauer permet la mise en évidence de la production d'acétoïne (ou 3-hydroxy-butanone) au cours de la fermentation butylène glycolique. Le test VP est beaucoup plus spécifique que le test RM qui ne donne qu'une idée globale du métabolisme (**Harley et Prescott, 2002**).

La lecture se fait en ajoutant 0,5 ml de KOH à 40% (p/v) (réactif VP1) et 0,5 mL d'alpha-naphtol (v/p) (réactif VP2) pour la mise en évidence de la présence d'acétoïne. Une réaction positive (VP+) se traduit par une coloration rose.

#### **4.11. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires**

La production d'acides mixtes est recherchée sur le même milieu. La lecture se fait par addition de quelques gouttes d'une solution au rouge méthyle. Une réaction positive (RM+) se traduit par le virage de la couleur du bouillon au rouge (**Harley et Prescott, 2002**).

##### **4.11.1. Détermination de l'activité amylolytique**

La présence de l'activité amylolytique est déterminée qualitativement selon la méthode décrite par **Amoozegar et al. (2003)**, en utilisant le milieu de base additionné de 1% (p/v) d'amidon soluble. Après incubation, les colonies sont inondées avec une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par apparition d'une zone claire autour de la colonie. À l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun.

##### **4.11.2. Détermination de l'activité de pectinolytique**

La présence de l'activité pectinolytique est déterminée qualitativement selon la méthode décrite par **Soares et al. (1999)**, en utilisant le milieu de base additionné de 1% (p/v) de pectine soluble. Après incubation, les colonies sont inondées avec une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par apparition d'une zone claire autour de la colonie. À l'inverse, les zones contenant de la pectine se colorent en brun clair.

#### 4.11.3. Détermination de l'activité protéolytique

- **Recherche de la caséinase**

Le milieu de base est supplémenté par 1% (p/v) de caséine. Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont incubées. La présence de cette activité est détectée par un halo clair autour des colonies indiquant une hydrolyse de la caséine (**Roxana et al., 2009**).

- **Recherche de la gélatinase**

Le milieu de base est supplémenté par 10% de gélatine, transféré dans des tubes à essai et incliné. L'ensemencement se fait par strie. Après incubation, les tubes sont placés au réfrigérateur pendant 10 minutes. La liquéfaction du milieu indique la production de gélatinase (**Roxana et al., 2009**).

#### 4.11.4. Détermination de l'activité lipolytique

La recherche d'estérase est effectuée par le test d'hydrolyse des Tweens 20 et 80 alors que celle de lipase est effectuée par l'hydrolyse de l'huile d'olive. Cette activité est recherchée sur milieu de base contenant 1% (v/v) de Tween 20 ou de Tween 80 (**Gonzalez et al., 1978**), ou encore de 2,5% (v/v) d'huile d'olive (**Sigurgísladóttir et al., 1993**). L'ensemencement des souches est effectué par touches. Après incubation, le développement d'un précipité autour des touches témoigne la présence d'une lipase.

- **Recherche de la lécithinase**

Ce milieu de culture est préparé en ajoutant 2mL d'une émulsion de jaune d'œuf et d'eau physiologique stérile 0,85% à 20mL de gélose nutritive, fondue et ramenée à  $47\pm 2^{\circ}\text{C}$ . L'ensemencement est effectué par touches. Après incubation pendant 24 h à  $37^{\circ}\text{C}$ , l'apparition de zones opaques autour des touches révèle la production de lécithinase (**Sharaf et al., 2014**).

# *Résultats et discussion*

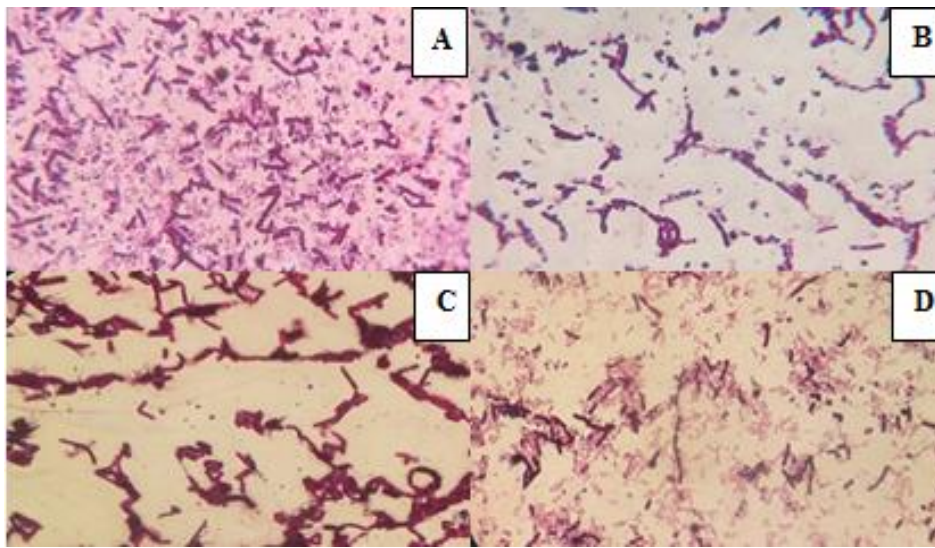
---

### 1. Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies

La caractérisation macroscopique et microscopique des souches figure dans le tableau 1.

La plupart des souches forment sur milieux solides des colonies crème à surface lisse, plates, circulaires, à bords irréguliers et dont le diamètre varie de 1 à 2 mm.

La coloration de Gram a révélé que tous les isolats présentent des bâtonnets à Gram positifs (Figure 1), souvent isolés ou disposés en chaînettes.



**Figure 1.** Résultats d'observations microscopiques après la coloration de Gram (G×100 à immersion). **A:** AC1, **B:** AC2, **C:** AC13, **D:** AC11.

**Tableau 1.** Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies.

Souches	Gram	Morphologie cellulaire	Mode de regroupement
AC1	+	Bâtonnet	Isolés
AC 2	+	Bâtonnet	En chaînette
AC3	+	Bâtonnet	Isolés
AC4	+	Bâtonnet	Isolés
AC5	+	Bâtonnet	En chaînette
AC6	+	Bâtonnet	Isolés
AC7	+	Bâtonnet	Isolés et en chaînette
AC8	+	Bâtonnet	En chaînette
AC9	+	Bâtonnet	Isolés

**Tableau 1.** Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies (suite).

Souches	Gram	Morphologie cellulaire	Mode de regroupement
AC10	+	Bâtonnet	En chaînette
AC11	+	Bâtonnet	En chaînette
AC12	+	Bâtonnet	En chaînette
AC13	+	Bâtonnet	En chaînette
AC14	+	Bâtonnet	Isolés et en chaînette
AC15	+	Bâtonnet	En chaînette

AC : Anchois.

## 2. Caractérisation physiologique des isolats

Les résultats de la caractérisation physiologique des isolats sont rassemblés dans le tableau 2.

### 2.1. Salinité

L'ensemble des souches isolées peuvent croître en absence et en présence de sel et qui peuvent être qualifiées selon Kushner (1978) d'halotolérantes. La plupart des isolats tolèrent des concentrations salines finales allant jusqu'à 10% (p/v). 3 souches sont capables de croître sur des milieux de culture dont la concentration saline finale peut atteindre 12,5% (p/v).

### 2.2.pH

L'intervalle de pH permettant la croissance de l'ensemble des souches se situe entre 5,0 et 10,0. Ce sont donc des légèrement acido-alcali-tolérantes.

### 2.3. Température

Cinq températures ont été explorées, 20; 30; 37; 40 et 60°C. Seulement deux souches ont la capacité de croître à 60°C.



**Tableau 2.** Caractérisation physiologique des isolats (salinité, température et pH).

Souches	Salinité (%) (p/v)	pH	Température (°C)
	Gamme	Intervalle	Gamme
AC1	0-12.5	5-10	25-37
AC 2	0-12.5	5-10	25-37
AC3	0-10	5-10	25-60
AC4	0-10	5-10	25-37
AC5	0-12.5	5-10	25-37
AC6	0-7.5	5-10	25-37
AC7	0-10	5-10	25-60
AC8	0-10	5-10	25-37
AC9	0-7.5	5-10	25-37
AC10	0-7.5	5-10	25-37
AC11	0-10	5-10	25-37
AC12	0-10	5-10	25-37
AC13	0-10	5-10	25-37
AC14	0-7.5	5-10	25-37
AC15	0-10	5-10	25-37

AC : Anchois.

### 3. Caractérisation biochimique des isolats

Les résultats de la caractérisation biochimique sont résumés dans le tableau 3.

#### 3.1. Mise en évidence de la catalase

Toutes les souches étudiées sont catalase positives. Elles sont donc aérobies ou anaérobies facultatives.

#### 3.2. Recherche de la $\beta$ -galactosidase

5 souches uniquement possèdent l'enzyme  $\beta$ -galactosidase

#### 3.3. Recherche du nitrate réductase

Tous les isolats sont capables de réduire les nitrates en nitrites grâce à l'enzyme nitrate réductase.

### **3.4. Recherche de l'uréase**

L'uréase est présente chez 4 souches uniquement.

### **3.5. Recherche de la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et l'arginine dihydrolase**

Les résultats ont montrés, que la production d'ADH est la plus fréquente (13 souches) que les productions de LDC (5 souches) et ODC (6 souches). Cependant, 2 souches possèdent les trois types d'enzymes.

### **3.6. Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons**

Toutes les souches sont incapables d'utiliser le citrate comme unique source de carbone et d'énergie.

### **3.7. Croissance sur le milieu Triple Sugar Iron (TSI)**

Les résultats de la croissance sur le milieu TSI, ont montré que l'ensemble des souches oxydent le lactose et/ou le saccharose et ne fermentent pas le glucose. Cependant il n'y a aucune production de H<sub>2</sub>S et de gaz.

### **3.8. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité**

La plupart des isolats sont faiblement positifs. Deux uniquement sont incapables de fermenter le mannitol et une seule est mobile.

### **3.9. Production d'indole**

Seulement 4 souches possèdent une tryptophanase responsable de la production d'indole, ce sont des indologènes.

### **3.10. Réactions de Voges Proskauer (VP) et au Rouge de Méthyle (RM)**

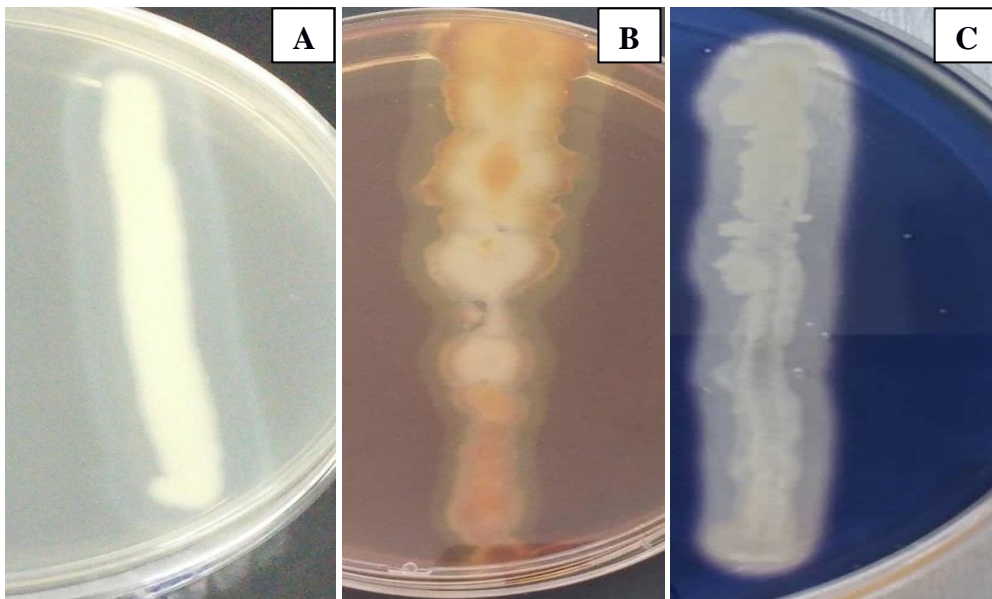
La production d'acides mixtes mise en évidence par la solution au rouge de méthyle est plus fréquente que celle d'acétoïne révélée par les réactifs VP1 et VP2. Une seule souche a la capacité d'exécuter les deux types de fermentations.

### **3.11. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires**

Le criblage d'activités hydrolytiques extracellulaires, amylase, pectinase, caséinase, gélatinase et lipase, estérase et lécithinase a été mis en évidence en utilisant respectivement 7

substrats différents : amidon, pectine, caséine, gélatine, huile d'olive, Tween 80 et Tween 20, jaune d'œuf, respectivement.

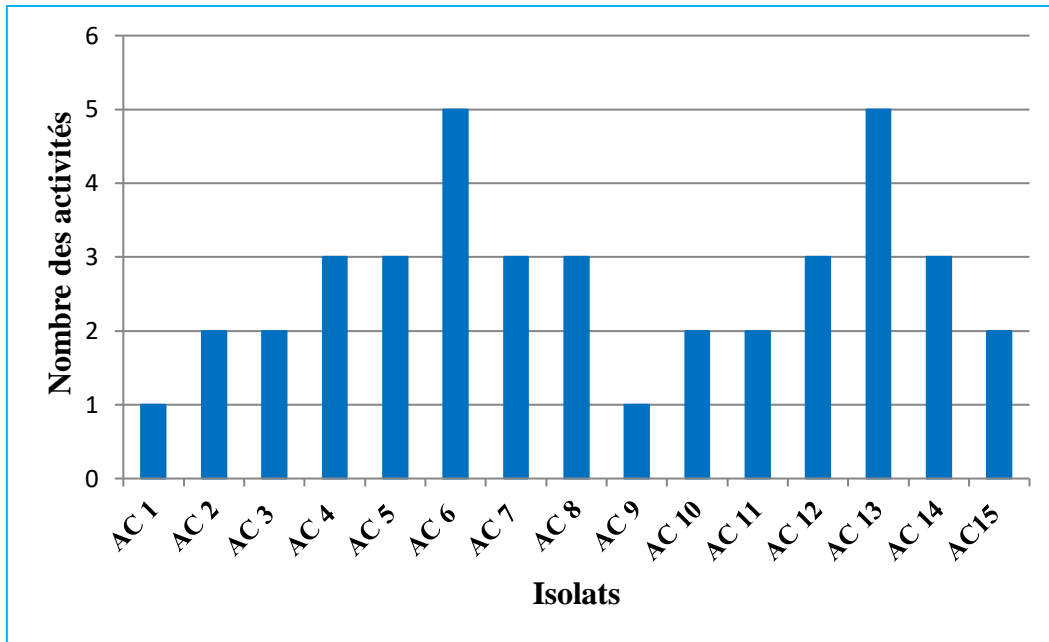
Tous les isolats sont producteurs d'enzymes hydrolytiques extracellulaires avec une prédominance de l'activité protéolytique (figure 2) suivie par l'hydrolyse de la lécithine. L'hydrolyse de l'amidon, la pectine et de l'huile d'olive est observée chez 6 souches alors que l'hydrolyse de la gélatine est révélée chez 5 souches. En revanche, aucune souche n'est trouvée capable d'hydrolyser les Tweens 20 et 80.



**Figure 2.** Exemples d'activités hydrolytiques extracellulaires.

**A:** Souche AC11, **B:** Souche AC6, **C:** Souche AC8.

Il est également intéressant de noter que des activités hydrolytiques combinées ont été détectées chez 13 isolats (Figure 3). Selon les résultats obtenus, il existe des souches qui possèdent 5 d'activités hydrolytiques différentes.



**Figure 3.** Nombre d'activités enzymatiques pour chaque isolat.

Tableau 3. Caractérisation biochimique des isolats.

Souches	Catalase	$\beta$ -galactosidase	Nitrate réductase	Uréase	LDC	ODC	ADH	Citrate de Simmons	Glucose	Lactose et/ou Saccharose	H <sub>2</sub> S	Gaz	Mannitol	Mobilité	Indole	Voges Proskauer	Rouge de Méthyle	Amylase	Pectinase	Caséinase	Gélatinase	Hydrolyse de l'huile d'olive	Hydrolyse de Tween 20	Hydrolyse de Tween 80	Lécithinase
AC1	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+f	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
AC 2	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+f	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
AC3	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+f	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
AC4	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+f	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
AC5	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+f	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
AC6	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+f	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
AC7	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+f	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
AC8	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+f	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
AC9	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+f	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
AC10	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+f	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
AC11	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+f	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
AC12	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+f	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
AC13	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+f	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
AC14	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
AC15	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-

AC: Anchois, (+) : Réaction positive, (-) : Réaction négative, (+f) : Réaction faiblement positive.

#### 4. Discussion

L'étude réalisée sur des échantillons isolés d'anchois salés et séchés avait pour objectif la caractérisation phénotypique et la mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des bactéries halotolérantes.

Les quinze souches testées forment sur milieu solide, des colonies crèmes à bords irréguliers, se présentant sous forme de bâtonnets à Gram positifs, de type respiratoire aérobie, c'est le cas des *Firmicutes* en particulier le genre *Bacillus* et organismes apparentés (**Oren, 2002**). En outre, elles sont incapables de croître au-dessus de 12,5% de NaCl, mais ont la capacité de se développer entre 0-7,5% de NaCl. Selon **Kushner (1978)**, ces isolats se qualifient d'halotolérants, puisqu'ils peuvent croître en absence et en présence de sel.

La plupart des isolats tolèrent une gamme de température de 25 à 37°C, on peut dire que nos isolats sont classés comme des mésophiles (**Bornert, 2000**). Ces isolats possèdent également une large gamme de pH allant de 5 jusqu'à 10. Leur résistance à plus d'un facteur extrême, les rendent intéressants pour des utilisations industrielles.

L'ensemble des isolats sont incapables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone et d'énergie et oxydent le lactose et/ou le saccharose. La fermentation du glucose est absente alors que celle de mannitol malgré qu'elle soit présente, est faible. Aucune production d'H<sub>2</sub>S et de gaz n'est observée.

L'ensemble des souches sont catalase positives, ce sont donc des aérobies ou anaérobies facultatives. Généralement, c'est le cas de la majorité des microorganismes halophiles aérobies et membres de la famille *Bacillaceae* (**Arahal et al., 2007; De la Haba et al., 2011**).

Elles possèdent une nitrate réductase et produisent faiblement l'indole et l'uréase. Ce caractère est fréquent chez ce type de microorganismes (**Chen et al., 2008; Peng et al., 2009; Biswas et Paul, 2013**). La production d'ADH est la plus fréquente que les productions de LDC et ODC. Cependant, 2 souches possèdent les trois types d'enzymes. Parallèlement celle des acides mixtes est plus fréquente que celle de d'acétoïnes. Cependant, un seul isolat est capable de réaliser les deux types de fermentations.

Tous les isolats étudiés sont producteurs d'hydrolases extracellulaires avec une prédominance de l'activité protéolytique en particulier l'activité caséinolytique révélée chez 11 isolats, suivie par l'hydrolyse de la lécithine, observée chez 7 isolats. L'hydrolyse de l'amidon, la pectine et de l'huile d'olive est observée chez 6 souches alors que l'hydrolyse de la gélatine est révélée chez 5

souches. Selon **Rohban et al. (2009)**, la plupart des isolats produisant des enzymes hydrolytiques étaient des bactéries à Gram-positifs appartenant à la famille des *Bacillaceae*.

En revanche, aucune souche n'est trouvée capable d'hydrolyser les Tweens 20 et 80. D'après **Babavalian et al. (2013)** et **Rohban et al. (2009)**, les bâtonnets à Gram négatifs ont des activités principalement lipolytiques contrairement aux isolats à Gram positifs, qui possèdent beaucoup plus des activités amylolytiques, protéolytiques, c'est probablement l'explication de nos résultats.

Il faut noter que des activités hydrolytiques extracellulaires combinées ont été observées chez 13 isolats, dont quelques souches possèdent cinq activités hydrolytiques à la fois, ce qui révèle leur atout biotechnologique. La présence de telle combinaison chez les halophiles a été rapportée par de nombreuses études (**Sánchez-Porro et al., 2003; Moreno et al., 2007; Rohban et al., 2009**).

# *Conclusion et perspectives*

---



Ces dernières années, les besoins en enzymes hydrolytiques ont énormément augmenté en raison de la reconnaissance du potentiel économique de ces enzymes dans divers domaines d'industrie.

L'objectif essentiel de ce travail était un screening des hydrolases extracellulaire produites par des souches halotolérantes.

Les souches testées se présentent sous forme de bâtonnets à Gram positifs isolés ou groupés en chainettes. Ce sont des holotolérantes mésophiles et légèrement acido-alcali-tolérantes.

Tous les isolats étudiés sont producteurs d'hydrolases extracellulaires avec une prédominance de l'activité protéolytique en particulier l'activité caséinolytique, suivie par l'hydrolyse de la lécithine, puis celle de l'amidon, la pectine et de l'huile d'olive et enfin celle de la gélatine. En revanche, aucune souche n'est trouvée capable d'hydrolyser les Tweens 20 et 80.

Il faut noter que des activités hydrolytiques combinées sont également observées ce qui rendent ces isolats plus intéressants pour des applications biotechnologiques.

Cette contribution à l'étude de la mise en évidence d'activités enzymatiques extracellulaires de souches bactériennes isolées d'anchois salés et séchés a donné des résultats très encourageants qui devront être complétés par une identification moléculaire des isolats, une optimisation des conditions de production des enzymes, leur purification et caractérisation et enfin leur application dans le domaine des industries agroalimentaires.

# *Références bibliographiques*

---

**ABABOUC, L. & EI MARRAKCHI, A. (2009).** Élaboration des semi-conserves d'anchois: aspects économiques, techniques et hygiéniques. *FAO : Document technique sur les pêches et l'aquaculture*. N° 525. Rome, 90.

**AHMED, S. A. SALEH, S. A. A., ABDEL-HAMEED, S. A. M. & FAYAD, A.M. (2019).** Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of free and immobilized caseinase on mica glass-ceramics. *Heliyon*, 5(5), e01674.

**AMOOZEGAR, M.A., MALEKZADEH, F. & MALIK, K.A. (2003).** Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *Journal of microbiological methods*, 52(3), 353-359.

**ARAHAL, D. R., VREELAND, R.H., LITCHFIELD, C.D., MORMILE, M.R., TINDALL, B.J., OREN, A, BEJAR, V., QUESADA, E. & VENTOSA, A. (2007).** Recommended minimal standards for describing new taxa of the family *Halomonadaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(10), 2436-2446.

**BABAVALIAN, H., AMOOZEGAR, M. A., POURBABAE, A. A., MOGHADDAM, M. M. & SHAKERI, F. (2013).** Isolation and identification of moderately halophilic bacteria producing hydrolytic enzymes from the largest hypersaline playa in Iran. *Microbiology*, 82(4), 466–474.

**BACHA, M. & AMARA, R. (2012).** Inter-cohtdifferences in growth condition and feeding of juvenile anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Gulf of Bejaia (Algerian coast SW Mediterranean): implications for recruitment success. *Fisheries Research*, 129, 73-81.

**BHARADWAJ, B. & GOPINATH, P. (2016).** Detection of Lipase and Lecithinase among Clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 9(11), 1909.

**BISWAS, J. & PAUL, A. K. (2013).** Production of extracellular enzymes by halophilic bacteria isolated from solar salterns. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 4, (4).30-36.

**BORNERT, G. (2000).** Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 151(11), 1003-1010.

**CALIMLIOGLU, B. & ARGA, K. Y. (2014).** Proteins from halophilic bacteria: purification and their applications. *Protein Purification-Principles and Trends*. Concept Press Ltd.

**CASTANO, C.A. & BARRAL, A.O. (1990).** On-board handling and preservation of anchovy (*Engraulis anchoita*) catches. *International journal of refrigeration*, 13(3), 203-206.

**CHEN, Y.G., CUI, X.L., ZHANG, Y.Q., LI, W.J., WANG, Y.X., XU, L.H., PENG, Q., WEN, M.L. & JIANG, C.L. (2008).** *Gracilibacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(10), 2403-2408.

**COIFFEC, G. (2006).** Analyse de la pêche des petites pélagiques sardines et anchois dans le golfe de Gascogne. ENSIA. IFREMER Lorient, 7-8.

**COLLIGNON, J. (1991).** Ecologie et biologie marines : introduction à l'halieutique. Masson, Paris, 298.

**COSNARD, M., VALLET, J.L. & KABBAJ, F. (1983).** Données sur le phénomène de la maturation de l'anchois. Science et Pêche, *Bulletin de l'Institut de la Pêche maritime*, N° 335, 5-7.

**DASSARMA, P., COKER, J.A., HUSE, V. & DASSARMA, S. (2009).** Halophiles, industrial applications. *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology*, 1-43.

**DE LA HABA, R.R., SÁNCHEZ-PORRO, C., MARQUEZ, M. C. & VENTOSA, A. (2011).** Taxonomy of halophiles, In: Extremophiles handbook Part 3 Edited by K. Horikoshi, p1248.

**DE LOURDES MORENO, M., PÉREZ, D., GARCÍA, M. & MELLADO, E. (2013).** Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life*, 3(1), 38-51.

**DE VOS, P., GARRITY, G.M., JONES, D., KRIEG, N.R., LUDWIG, W., RAINEY, F.A., SCHLEIFER, K.H. & WHITMAN, W.B. (2009).** Volume N°3. The Firmicutes. In G.M. GARRITY (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition. Springer-Verlag, New York: [I]-XXVI, 1-1422.

**DELGADO-GARCIA, M., VALDIVIA-URDIALES, B., AGUILAR-GONZALEZ, C. N., CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C. & RODRIGUEZ-HERRERA, R. (2012).** Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(13), 2575–2580.

**ENACHE, M. & KAMEKURA, M. (2010).** Hydrolytic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values. *Romanian Journal of Biochemistry*, 47(1), 47-59.

**FONTANA, R. C. & SILVEIRA, M. M. (2012).** Influence of pectin, glucose, and pH on the production of endo- and exo-polygalacturonase by *Aspergillus oryzae* in liquid medium. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29(4), 683-690.

**FRÉON, P., CURY, P., SHANNON, L. & ROY, C. (2005).** Sustainable exploitation of small pelagic fish stocks challenged by environmental and ecosystem changes: a review. *Bulletin of marine science*, 76 (2), 385-462.

**GERHARDT, P., MURRAY, R. G. E., WOOD, W. A. & KRIEG, N. R. (1994).** Methods for General and Molecular Bacteriology. Washington, DC. ASM, p791.

**GONZALEZ, C., GUTIERREZ, C. & RAMIREZ, C. (1978).** *Halobacterium vallismortis* sp.nov. an amyolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Canadian journal of microbiology*, 24(6), 710-715.

**GOPINATH, S. C., ANBU, P., ARSHAD, M. K., LAKSHMIPRIYA, T., VOON, C. H., HASHIM, U. & CHINNI, S. V. (2017).** Biotechnological processes in microbial amylase production. *BioMed research international*, 2017.

**GRAM, C. (1884).** The Differential Staining of *Schizomycetes* in Tissue Sections and in Dried Preparations. *Fortschitte der Medicin*, 2, 185-189.

**GUIRAUD, J. (1998).** Microbiologie alimentaire. Edition Dunod, Paris, pp. 8-101.

**HARLEY, J.P. & PRESCOTT, L.M. (2002).** Laboratory Exercises in Microbiology, 5<sup>ème</sup> Edn, 449.

**HERNANDEZ-HERRERO, M. M., ROIG-SAGUES, A. X., LOPEZ-SABATER, E. I., RODRIGUEZ-JEREZ, J. J. & MORA-VENTURA, M. T. (2002).** Influence of raw fish

quality on some physicochemical and microbial characteristics as related to ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus* L). *Journal of Food science*, 67(7), 2631-2640.

**JOFFIN, J.N. & LEYRAL, G. (2006).** Microbiologie technique, tome 1: dictionnaire des techniques 4<sup>ème</sup>Edn, 361.

**JOSHI, M., NERURKAR, M. & ADIVAREKAR, R. (2013).** Use of *citrus limetta* peels for pectinase production by marine *Bacillus subtilis*. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 12, 75.

**KAMEKURA, M. (1998).** Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles*, 2, 289-295.

**KHARROUB K. (2007).** Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkhia Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse de doctorat, Université Mentouri-Constantine, pp.1-229.

**KUMAR, S., KARAN, R., KAPOOR, S., SINGH, S. P. & KHARE, S. K. (2012).** Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1595-1603.

**KUSHNER, D.J. & KAMEKURA, M. (1978).** Physiology of halophilic eubacteria .In *Halophilic Bacteria*; Rodríguez-Varela, F., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, (1988), pp. 109-138.

**LLORENTE HOLGADO, R., ALTONAGA ZUBIAGA, M., PERAL DÍEZ, IBARGÜEN SALAVERRI, I., I., M. & GARTZIA PALACIOS, I. (2007).** Salting dynamics for anchovy (*Engraulis encrasicolus*) with salt replacers.

**MARGESIN, R. & SCHINNER, F. (2001).** Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), 73–83.

**MATHABATHA, E. S. (2010).** Diversity and industrial potential of hydrolase-producing halophilic/halotolerant eubacteria. *African Journal of Biotechnology*, 9(11), 1555–1560.

**MORENO, M.L., MELLADO, E., GARCIA, M.T. & VENTOSA, A. (2007).** Diversity of extreme halophiles producing hydrolytic enzymes in hypersaline habitats. *Halophiles booklet*, 59–60.

**NIZINSKI, M.S. & MUNROE, T.A. (1999).** National Marine Fisheries Service, National Museum of Natural History, Washington D.C., USA: bony fish, 764.

**OREN, A. (2002).** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 56-63.

**PATEL, S. & SARAF, M. (2015).** Perspectives and application of halophilic enzymes. In *Halophiles* (pp. 403-419). Springer, Cham.

**PATHAK, A. P. & RATHOD, M. G. (2017).** Production and characterization of thermostable gelatinase from *Bacillus globisporus* isolated from Unkeshwar hot spring of Maharashtra. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*, 46(9), 1883-1888.

**PATIL, R.C. & JADHAV, B.L. (2017).** Isolation and Characterization of Protease Producing *Bacillus* Species from Soil of Dairy Industry. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(6), 853-860.

**PENG, Q. Z., PENG, Q. J., ZHANG, Y. Q., LIU, Z. X., WANG, Y. X., LI, W. J. & CHEN, Y. G. (2009).** *Halobacillus hunanensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a subterranean brine. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 96(4), 497-504.

**RAJAN, L.A., JOSEPH, T.C., THAMPURAN, N. & JAMES, R. (2010).** Studies on the microbial diversity of salted fishes under aerobic conditions. *Microbiology Research*, 1(1), e5-e5.

**ROHBAN, R., AMOOZEGAR, M. A. & VENTOSA, A. (2009).** Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(3), 333-340.

**ROXANA, C., SIMONA, M., GABRIELA, P., LUCIA D., KAMEKURA, M. & MĂDĂLIN, E. (2009).** Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal, 5, 4458-4466.

**RUSSELL, N. J. (1989).** Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 21(1), 93-113.

**SANCHEZ-PORRO, C., MARTIN, E., MELLADO, S. & VENTOSA, A. (2003).** Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of applied microbiology*, 94(2), 295-300.

**SHARAF, E. F., EL-SAYED, W. S. & ABOSAIF, R. M. (2014).** Lecithinase-producing bacteria in commercial and home-made foods: Evaluation of toxic properties and identification of potent producers. *Journal of Taibah University for Science*, 8(3), 207–215.

**SIGURGÍSLADÓTTIR, S., KONRÁÐSDÓTTIR, M., JÓNSSON, Á., KRISTJÁNSSON, J. K. & MATTHIASSON, E. (1993).** Lipase activity of thermophilic bacteria from Icelandic hot springs. *Biotechnology Letters*, 15(4), 361-366.

**SOARES, M. M., SILVA, R. D. & GOMES, E. (1999).** Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, 30(4), 299-303.

**SURIYA, J., BHARATHIRAJA, S., KRISHNAN, M., MANIVASAGAN, P. & KIM, S. K. (2016).** Marine Microbial Amylases: Properties and Applications. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 79, pp. 161-177). Academic Press.

**WADITEE-SIRISATTHA, R., KAGEYAMA, H. & TAKABE, T. (2016).** Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology. *AIMS Microbiology*, 2, 42-54.

**WOILLEZ, M. (2007).** Contributions géostatistiques à la biologie halieutique. Thèse de doctorat. Géosciences et Ressources Naturelles, Paris, 1-7.

**YIN, J., CHEN, J.C., WU, Q. & CHEN, G.Q. (2015).** Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1433–1442.



# *Annexe*

---

<b>Tableau 4.</b> Milieux de culture utilisés pour la caractérisation biochimique (Harley et Prescott, 2002).			
<b>Milieu</b>	<b>Urée de Christensen pH (6.8 ± 0.2)</b>	<b>Bouillon nitraté pH (7.3 ± 0.2)</b>	<b>Eau peptonée pH (7.4 ± 0.2)</b>
<b>Constituant</b>	<b>Quantité (g)</b>		
NaCl		0,5	
Rouge de phénol	0,0012		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2		
NaNO <sub>3</sub>		1	
Glucose	0,1		
Urée	2,4		
Extrait de levure			0,5
Peptone	0,1	1	0,1
Extrait de bœuf		1	
Agar	2		
Eau distillée	100mL	100mL	100mL

**BOUMAZA Loubna**

Thème: **Screening d'hydrolases extracellulaires chez des bactéries halotolérantes isolées d'anchois salés et séchés.**

Nature du diplôme: **Master en Microbiologie Appliquée.**

**Résumé**

L'objectif de ce travail est le screening d'enzymes hydrolytiques extracellulaires de bactéries halotolérantes isolées d'anchois salés et séchés, un poisson très consommé conservé par le sel et séché à l'air libre.

Les souches testées se présentent sous forme de bâtonnets à Gram positifs isolés ou groupés en chainettes. Ce sont des holotolérantes, mésophiles et légèrement acido-alkali-tolérantes.

Tous les isolats étudiés sont producteurs d'hydrolases extracellulaires avec une prédominance de l'activité protéolytique en particulier l'activité caséinolytique.

Il faut noter que des activités hydrolytiques combinées sont également observées ce qui leur confère un véritable atout biotechnologique.

**Mots-clés:** Screening, enzymes hydrolytiques extracellulaires, anchois salés et séchés, bactéries halotolérantes.

**Abstract**

The objective of this work is the screening of extracellular hydrolytic enzymes of halotolerant bacteria isolated from dry salted anchovies, a highly consumed fish preserved by salt and dried in the free air.

The tested strains are Gram positive rods isolated or grouped into chains. They are holotolerant, mesophilic and slightly acido-alkali-tolerant.

All the isolates studied are producers of extracellular hydrolases with a predominance of proteolytic activity, in particular caseinolytic activity.

It should be noted that combined hydrolytic activities are also observed which gives them a veritable biotechnological interest.

**Key words:** Screening, extracellular hydrolytic enzymes, dry salted anchovies, halotolerant bacteria.

**المخلص :**

كان الهدف من هذا العمل فحص الإنزيمات المفترزة خارج الخلية والتي دورها الهدم، لمجموعة من البكتيريا محتملة للملح و المعزولة من الأنشوة المملحة والمجففة، هذه السمكة مستهلكة بدرجة كبيرة، يتم حفظها بواسطة الملح وتجفيفها في الهواء الطلق.

جميع السلالات التي تم إختبارها ظهرت في شكل عصيات إيجابية الغرام، معزولة أو مجتمعة في سلاسل. هي سلالات محتملة للملح و تفضل الحرارة المعتدلة، لكنها أقل تحملا للأوساط الحامضية والقاعدية.

جميع العزلات التي شملتها الدراسة قادرة على إفراز الإنزيمات خارج الخلية والتي دورها الهدم، مع هيمنة لنشاط التحلل البروتيني، و خاصة نشاط تحلل الكازيين. قدمت العديد من السلالات مزيجا متنوعا من الأنشطة التحلل، ما يعطيها ميزة التكنولوجيا الحيوية.

**الكلمات المفتاح:** بحث، إنزيمات مفترزة خارج الخلية و دورها الهدم، أنشوة مملحة ومجففة، بكتيريا محتملة للملح.