

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 Ben Yahia -Jijel-

M.MB.03/16

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

En vue 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 : M<sup>me</sup> Bekka F.

Examinatrice : Dr Laggoune S.

Encadreur: M<sup>lle</sup> Ayad R.



01  
01

#### Présenté par :

M<sup>lle</sup> Chefirat Sonia

M<sup>lle</sup> Titous Soumia

Année Universitaire: 2015-2016

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

## Remerciements

*Nous tenons à remercier en premier lieu ALLAH qui nous a donné la volonté, la confiance et le courage pour faire ce travail.*

*Nous remercions nos très chers parents pour leurs soutiens et leurs patiences.*

*Nous remercions notre honorable encadreur Mlle Rima Ayad pour son suivi et ses conseils durant l'évolution de ce travail.*

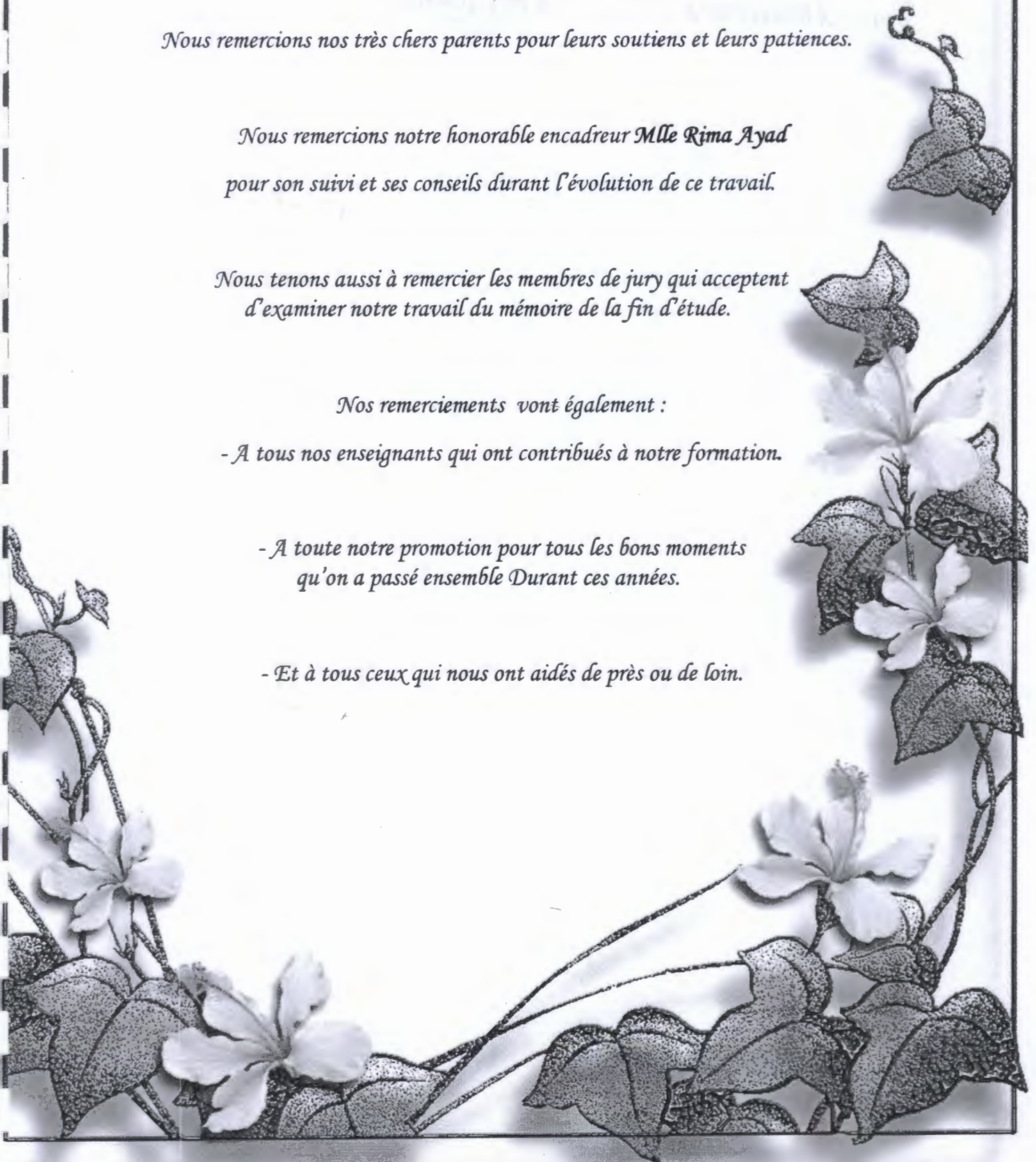
*Nous tenons aussi à remercier les membres de jury qui acceptent d'examiner notre travail du mémoire de la fin d'étude.*

*Nos remerciements vont également :*

*- A tous nos enseignants qui ont contribués à notre formation.*

*- A toute notre promotion pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble Durant ces années.*

*- Et à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin.*



## Sommaire

	Page
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
<b>Introduction</b> .....	1
<b>Synthèse bibliographique</b>	
1. Généralités sur l'anchois.....	3
1.1. Morphologie.....	3
1.2. Habitat.....	3
1.3. Alimentation.....	4
1.4. Croissance.....	5
1.5. Reproduction des anchois. ....	5
1.6. Technologie des semi-conserves d'anchois salés.....	5
1.6.1. Pré-salage.....	6
1.6.2. Salage. ....	6
1.6.3. Étêtage-Eviscération.....	6
1.6.4. Lavage-Egouttage.....	6
1.6.5. Salage-Maturation.....	7
1.6.6. Lavage-égouttage.....	8
1.6.7. Filetage.....	8
1.6.8. Conditionnement.....	8
1.6.9. Marquage.....	8
1.6.10. Lavage.....	8
1.6.11. Entreposage.....	8
1.7. Caractéristiques du produit fini.....	8
1.7.1. Modifications physico-chimiques.....	9
1.7.2. Modification microbiologique au cours de l'anchoitage.....	9
2. Microorganismes halotolérants et halophiles.....	10
2.1. Définitions.....	10
2.2. Diversité phylogénétique des halotolérants et halophiles.....	10
2.3. Adaptation aux milieux salés.....	11
2.3.1. Accumulation de KCl.....	11

## Sommaire

2.3.2. Biosynthèse et/ou accumulation de solutés compatibles.....	12
3. Potentiel biotechnologique des enzymes halotolérantes et halophiles.....	12
3.1. Amylases.....	13
3.2. Pectinases.....	13
3.3. Protéases .....	14
3.4. Lipases et Estérases.....	14

### Matériels et méthodes

1. Préparation d'anchois salés et séchés.....	16
2. Isolement et purification des isolats.....	16
1. Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies.....	17
3.1. Examen macroscopique.....	17
3.2. Examen microscopique.....	17
3.2.1. Coloration de Gram.....	17
3.2.2. Coloration des spores au vert de Malachite.....	17
4. Caractérisation physiologique des isolats.....	18
4.1. Salinité.....	18
4.2. pH.....	18
4.3. Température.....	18
5. Caractérisation biochimique des isolats.....	18
5.1. Mise en évidence de la catalase.....	18
5.2. Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons.....	18
5.3. Recherche de la $\beta$ -galactosidase.....	19
5.4. Recherche de la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et l'arginine dihydrolase.....	19
5.5. Croissance sur le milieu Triple SugarIron (TSI) .....	19
5.6. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité.....	19
5.7. Production d'indole.....	20
5.8. Réactions de Voges Proskauer (VP) et au Rouge de Méthyle (RM).....	20
5.9. Recherche de l'uréase.....	20
5.10. Recherche du nitrate réductase.....	21
5.11. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires.....	21
5.11.1. Détermination de l'activité amylolytique.....	21
5.11.2. Détermination de l'activité de pectinolytique.....	21
5.11.3. Détermination de l'activité protéolytique.....	22

## *Sommaire*

5.11.4. Détermination de l'activité lipolytique.....	22
--	----

### **Résultats et discussion**

1. Isolement et purifications des isolats .....	23
2. Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies.....	23
2.1. Examen macroscopique.....	23
2.2. Examen microscopique.....	23
3. Caractérisation physiologique des isolats.....	25
3.1. Salinité.....	25
3.2. Température.....	25
3.3. pH.....	25
4. Caractérisation biochimique des isolats.....	26
4.1. Recherche de la catalase.....	26
4.2. Utilisation de citrate sur le milieu au citrate de Simmons.....	27
4.3. Recherche de la $\beta$ -galactosidase.....	27
4.4. Recherche de la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et l'arginine dihydrolase.....	27
4.5. Croissance sur le milieu Triple SugarIron (TSI) .....	27
4.6. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité.....	27
4.7. Production d'indole.....	27
4.8. Réactions de Voges Proskauer (VP) et au Rouge de Méthyle (RM) .....	27
4.9. Recherche de l'uréase.....	27
4.10. Recherche du nitrate réductase.....	28
4.11. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires.....	28
5. Discussion.....	31
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>34</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>36</b>

**Annexe**

**Résumés**

## *Liste des abréviations*

**ADH:** Arginine Dihydrolase

**ADN:** Acide désoxyribonucléotidique

**ARN:** Acide ribonucléotidique

**ARNr 16S:** Acide ribonucléique codant pour la petite sous-unité 16S de l'ARN ribosomal

**A<sub>w</sub> :** activité de l'eau

**CaCl<sub>2</sub>:** Chlorure de calcium

**CaSO<sub>4</sub>:** sulfate de calcium

**EC:** Enzyme Commission numbers

**FeCl<sub>3</sub>:** Tri-chlorure de fer

**HM :** Halophilic Medium

**KCl:** Chlorure de potassium

**kDa:** kilodalton

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

**LDC:** Lysine Décarboxylase

**M:** Molarité

**MgCl<sub>2</sub>:** Chlorure de magnésium

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:** Carbonate de sodium

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:** Di-sodium hydrogénophosphate

**NaBr:**Bromure de sodium

**NaCl:** Chlorure de sodium

**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Dihydrogénophosphate de sodium

**NaHCO<sub>3</sub>:** Hydrogénocarbonate de sodium

**NaOH:** Hydroxyle de sodium

**NH<sub>4</sub>Cl:** Chlorure d'ammonium

**NRC:** National Research Council

**ODC:** Ornithine Décarboxylase

**p/v :** poids par volume

**sp. :** Espèce non précisée

**spp. :** Espèces non précisées

**Subsp.:** sous-espèce

## *Liste des Figures*

<b>Figure 1</b> : Photo représentant l'espèce <i>Engraulis encrasicolus</i> .....	4
<b>Figure 2</b> : Exemples d'aspects macroscopiques des isolats cultivés sur le milieu HM.....	23
<b>Figure 3</b> :Exemples d'observations microscopiques de la coloration de Gram à l'immersion (x100).....	24
<b>Figure 4</b> : Exemples d'activités hydrolytiques.....	29

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1:</b> Composition chimique de muscle d'anchois de deux espèces différentes.....	4
<b>Tableau 2:</b> Classification des halotolérants et halophiles.....	10
<b>Tableau 3:</b> Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies.....	24
<b>Tableau 4:</b> Caractérisation physiologique des isolats (salinité, pH et température).....	26
<b>Tableau 5:</b> Caractérisation biochimique des isolats.....	30



# *Introduction*

---

De tous temps, l'homme a préféré de consommer le poisson plutôt frais. Cependant le poisson s'abîmant très rapidement, l'homme a dû, depuis les temps les plus reculés, élaborer des méthodes pour le conserver. S'il est proprement conservé, il deviendra un aliment de haute valeur nutritive (Diop, 2007).

L'anchois européen, *Engraulis encrasicolus*, est un petit poisson pélagique largement répandu de la mer du Nord au centre de l'Afrique en colonisant la Méditerranée et la mer Noire (Grant et Bowen, 1998). Comme tous les poissons, ce petit poisson peut subir des altérations plus au moins profondes. Ces altérations sont dues à l'activité enzymatique propre à la matière elle-même, mais également au développement microbien. Pour atténuer ces altérations on peut opérer à un salage. Ce dernier compte parmi les méthodes de conservation du poisson en général et des anchois en particulier, est pratiqué traditionnellement dans de nombreuses régions du monde. C'est une technique très simple qui n'exige que du sel et parfois de l'eau. Très souvent, le salage est utilisé en combinaison avec le séchage et le fumage. Dans la méthode traditionnelle, l'action du soleil et du vent servent à effectuer un séchage par évaporation. Etant donné que l'eau est essentielle à l'activité de tous les organismes vivants, son élimination ralentit ou arrête l'activité microbologique ou autolytique et peut donc représenter une méthode de préservation (Diop, 2007).

Toutefois, si le salage ne s'effectue pas correctement, notamment si le poisson est de qualité médiocre et les quantités de sel insuffisantes, les produits peuvent se dégrader et être impropres à la consommation. Donc pour assurer une bonne conservation des anchois et que le salage soit efficace, il faut faire en sorte que l'écoulement de l'eau et l'absorption de sel se produisent aussi rapidement que possible. Par la suite, seuls les microorganismes halophiles et halotolérants peuvent croître. En raison de leur pouvoir adaptatif à la salinité, ces microorganismes ont trouvé des applications biotechnologiques dans divers domaines (Oliveira et al., 2014).

De nombreuses études relevant, à des degrés divers, de l'écologie microbienne des environnements salins (eaux, sol, aliment, etc.) se sont multipliées. Afin d'enrichir nos connaissances sur la microbiologie d'un poisson très consommé « l'anchois », nous avons décidé d'entreprendre ce travail. Dans une première partie on va faire une synthèse bibliographique relative à des généralités sur l'anchois, des notions sur les microorganismes halotolérants et halophiles, et enfin le potentiel biotechnologique des enzymes isolées de ces microorganismes. Dans une seconde partie, on va étudier toutes les techniques utilisées lors de la partie expérimentale, dans la quelle on va réaliser :

- Une préparation des échantillons d'anchois salés et séchés ;
- Un isolement et une purification des souches obtenues ;
- Des caractérisations morphologique, physiologique et biochimique des isolats ;

- Mise en évidence de la présence d'enzymes hydrolytiques extracellulaires.

Et enfin tous les résultats obtenus sont comparés et discutés.

*Synthèse*

---

*Bibliographique*

## 1. Généralités sur l'anchois

### 1.1. Morphologie

L'anchois est un petit poisson pélagique, appartenant à la famille des *Engraulidae*, sa croissance est rapide mais d'une vie brève, rares sont les anchois qui dépassent les 4 ans (Kada et al., 2009). Ces poissons occupent les premiers maillons de la chaîne alimentaire et tiennent une place majeure dans l'écosystème marin (Léopold, 2014).

Le corps de l'anchois est bleu brillant, allongé, de taille de 14 à 17cm, les branchicténies dépassent les yeux, la bouche renferme des petites dents subterminales, ainsi la mâchoire inférieure est plus courte que la supérieure (Ababouch et El Marrakchi, 2009 ; Kada et al., 2009).

Le dos de l'anchois, d'une couleur bleu sombre lui permet la non détection par les oiseaux, les côtés et le ventre sont argentés (Dewi, 2001).

### 1.2. Habitat

Généralement, les anchois se trouvent dans toutes les mers et océans. Les plus grandes concentrations d'anchois se trouvent vers la côte, mais parfois elles se trouvent entre la surface et le fond de l'eau. Les anchois de la côte sont plus recherchés par rapport à leur caractère organoleptique supérieur à celui des anchois du fond (Kada et al., 2009).

Il y a environ 145 espèces d'anchois, dont plusieurs espèces de la famille des engraulidés présentant un intérêt commercial et principalement les espèces *Engraulis ringens* (anchois), *Engraulis japonicus* (anchois japonais), *Engraulis encrasicolus* (anchois européen), *Engraulis anchoita* (anchois argentin), *Engraulis capensis* (anchois d'Afrique du Sud), et *Engraulis mordax* (Ababouch et El Marrakchi, 2009).

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

L'*Engraulis encrasicolus* a un corps allongé et mince, un boutoir conique et saillant, des yeux plutôt grands, une bouche large avec une mâchoire supérieure allongée. Son dos est de couleur plutôt vert bleu, son flanc et son ventre sont argentés et une rayure grise bleue s'étend parfois entre le dos noir et les flancs plus clairs (figure 1), et les larves trouvés généralement dans les eaux moins salées.

Actuellement, l'anchois européen est commercialisé en tant que poisson salé, en semi-conserves, frais ou congelé (Martin et *al.*, 2008; Ababouch et El MARRAKCHI, 2009)



**Figure 1:** Photo représentant l'espèce *Engraulis encrasicolus* (Ababouch et El MARRAKCHI, 2009).

### 1.3. Alimentation

Les anchois sont nourris principalement sur des zooplanctons ainsi que des phytoplanctons (Léopold, 2014).

L'anchois est très bon pour la santé comme l'indiquent certaines études, la composition chimique des anchois contient une teneur élevée en acide gras insaturée (Omega 3), qui est adapté pour les régimes alimentaires et en particulier pour la nourriture des enfants et des personnes âgées, cette teneur élevée donne des effets anti-inflammatoires, l'ajustement du métabolisme du calcium et améliore les fonctions du système nerveux et le système immunitaire, ainsi que les acides gras augmentent le cholestérol HDL et réduisent le cholestérol LDL (Dewi, 2001).

La composition chimique des anchois varie en fonction de la saison et du cycle sexuel et trophique. Les lipides présentent les variations les plus marquées, aussi cette composition varie d'une espèce à l'autre (tableau 1) (Ababouch et El MARRAKCHI, 2009).

**Tableau 1:** Composition chimique de muscle d'anchois de deux espèces différentes (Ababouch et El MARRAKCHI, 2009).

Constituants (%)	<i>E. japonicus</i>	<i>E. encrasicolus</i>
Eau	73,4	78,4
Protéines	15,1	15,3
Lipides	6,3	3,5
Carbohydrates	0,4	1,6
Matière minérale	4,8	2,1

#### **1.4. Croissance**

La croissance des anchois est la même que les autres poissons. Elle se poursuit pendant toute la durée de sa vie. Comme indiqué ci-dessus. Généralement les anchois ne dépassent pas les 4 ans, cette caractéristique est commune aux anchois d'autres mers du monde. Lorsque les larves atteignent environ 4,5mm, elles perdent le sac vitellin et la bouche devient fonctionnelle. Durant les stades de croissance, au début les anchois ont une longueur de 5 à 7cm jusqu'à 4 ou 5 mois, et 12cm après une année, et 13 à 14cm en 2 ans. Au bout de 3 ans, leur croissance atteint 15 à 17cm (Dewi, 2001).

#### **1.5. Reproduction des anchois**

Généralement quand les anchois atteignent une année ils seront capables de reproduire, avec une taille de 12,5cm (est à peu près le même pour les deux sexes) (Motos, 1996; Mezedjri et al., 2013).

Le cycle sexuel de l'anchois est constitué par 4 étapes :

- une phase de maturation (lente) : cette phase commence au mois de Mars jusqu'à le mois de Juin ;
- une phase d'activité sexuelle importante et intense : cette phase commence au mois de Juin jusqu'à le mois de Septembre (mois chauds) ;
- une phase de déclin : cette phase commence au mois de Septembre, au cours de laquelle les testicules et les ovaires perdent progressivement leur masse ;
- une phase de repos : durant cette phase les poissons deviennent sexuellement inactifs, et commence au mois de Décembre jusqu'à le mois de Février;

Donc la température joue un rôle très important et influence sur le cycle de reproduction des anchois, les températures élevées conduisent à la ponte (activité sexuelle) et les températures basses empêchent l'activité sexuelle (Mezedjri et al., 2013).

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

Le salage du produit avant le séchage n'est pas nécessaire, mais il est important, car le salage empêche le développement des micro-organismes à la surface du produit et éloigne les insectes et autres parasites pendant le séchage, donc le salage ralentit la dégradation du produit (Berkel et al., 2005).

La technique des semi-conserves d'anchois est basée sur l'action du sel comme stabilisateur pour la conservation, et sans l'intervention du traitement thermique et les différents additifs alimentaires.

Après le salage on obtient des anchois matures dit «anchoités». Donc le sel donne un produit fini plus stable avec une durée de conservation plus longue (Berkel et *al.*, 2005; Ababouch et El Marrakchi, 2009).

Le processus d'anchoitage est basé sur des réactions chimiques qui dépendent de différents paramètres physico-chimiques (température, durée, pression, pH, teneur en sel, activité de l'eau, etc.) et à la biologie du poisson (teneur en graisses, enzymes, bactéries, etc.) (Durand, 1982).

La réussite de l'anchoitage dépend de la qualité de la matière première et les ingrédients pour l'obtention d'un produit fini aux caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques désirées, donc la qualité de la matière première est très importante (Ababouch et El Marrakchi, 2009).

Le salage de l'anchois est basé sur l'évolution de la chair de poisson suite au traitement au sel, le phénomène essentiel est une hydrolyse (Durand, 1982). Les étapes industrielles de salage sont les suivantes :

#### **1.6.1. Pré-salage**

Le pré-salage consiste à mélanger le poisson avec 3 à 5% de sel sec ou une saumure saturée dans de grandes cuves dans le but de prévenir un début d'altération de ce poisson petit et fragile, pendant quelques heures (Cosnard et *al.*, 1983).

#### **1.6.2. Salage**

Cette étape caractérisée par le mélange de l'anchois avec du sel au taux de 25 à 30%. Le sel pénètre dans la chair et limite la multiplication bactérienne, l'exsudation du liquide de constitution et de sang ainsi que la formation de saumure. La durée de cette étape est de quelques jours à 2 mois (Durand, 1982).

#### **1.6.3. Étêtage-Eviscération**

Cette étape consiste à éliminer manuellement la tête et les branchies, le cœur et une partie des viscères. Les viscères contiennent des enzymes qui participent à la maturation du muscle de l'anchois. La durée de cette étape est de quelques heures (Durand, 1982).

#### **1.6.4. Lavage-Egouttage**

Le but de cette étape est d'éliminer les débris des viscères encore adhérents, le sang et les fèces répandus sur la chair. Le poisson lavé est mis à égoutter quelques minutes avant de subir l'opération de salage-maturation (Ababouch et El Marrakchi, 2009).



### **1.6.5. Salage-Maturation**

Dans cette étape les anchois sont déposés dans des fûts. Les couches d'anchois sont alternées avec des couches de sel à des concentrations du sel de 15 à 20 %, dont la première et la dernière couche étant formées uniquement de sel. Après le remplissage des fûts, on exerce une pression physique sur les anchois à l'aide d'un disque en bois placé à l'extrémité supérieure du fût, afin de permettre l'exsudation du liquide tissulaire et des graisses. Les fûts sont entreposés à température ambiante pendant 4 à 6 mois en moyenne pour permettre la maturation, cette durée varie en fonction des conditions ambiantes de température, de pressage et de durée de maturation, etc. (Ababouch et El Marrakchi, 2009).

- **Température**

La température influence les processus enzymatiques d'anchoitage, dont, une température élevée accélère les réactions biochimiques, particulièrement la protéolyse, et par conséquent, on obtient un produit altéré. Par contre, à basse température (entre 12 à 15°C) on aboutit à une maturation convenable mais, dans ces conditions, la durée de l'anchoitage est prolongée; d'où une température idéale pour l'anchoitage se situe entre 18 et 20°C, ce qui permet d'obtenir un produit dit «anchoité» en trois mois (Ababouch et El Marrakchi, 2009).

- **Pressage**

Le pressage a pour effet d'augmenter la teneur en extrait sec, de diminuer l'activité de l'eau ( $a_w$ ) tout en favorisant la pénétration rapide du sel, ce qui permet de stabiliser le produit du point de vue microbiologique. Dans le cas des pressions élevées, il y a un ralentissement de la vitesse de maturation et une accélération de la pénétration du sel. On obtient un produit ne présentant pas les meilleures caractéristiques sensorielles (Ababouch et El Marrakchi, 2009).

- **Durée de l'anchoitage**

Ce facteur est étroitement lié à la température et au degré de pressage, qui ralentit les processus enzymatiques de l'anchoitage, et par conséquent, une augmentation de la durée. Selon les professionnels, une maturation de longue durée aboutit à l'obtention d'un produit de très bonne qualité commerciale. Par contre, une maturation rapide à température élevée présente le risque de développement de bactéries indésirables, telles que les bactéries d'altération ou pathogènes (Ababouch et El Marrakchi, 2009).

#### **1.6.6. Lavage-égouttage**

Le but de cette étape est de débarrasser le poisson des restes de sel et de le préparer pour l'opération de filetage. Ce lavage se fait à l'aide d'une saumure saturée, qui est préparée en utilisant de l'eau potable, pour l'objectif d'éviter des pertes de sel intramusculaire (Ababouch et El Marrakchi, 2009).

#### **1.6.7. Filetage**

Cette étape doit s'effectuer le plus rapidement possible et dans des conditions d'hygiène personnelle afin d'obtenir un produit sain. Il consiste à lever parallèlement à la colonne vertébrale sur toute la longueur du poisson (Ababouch et El Marrakchi, 2009).

#### **1.6.8. Conditionnement**

Les filets sont disposés manuellement dans les boîtes en aluminium, en fer blanc ou en matériaux flexibles et stérile, ou en pots en verre. L'ensemble est alors pesé pour normaliser le contenu en fonction de la capacité déclarée de chaque contenant (Ababouch et El Marrakchi, 2009).

#### **1.6.9. Marquage**

Le but de cette étape est d'informer l'utilisateur sur le produit et de répondre aux exigences de la traçabilité nécessaire à l'identification du lot (Ababouch et El Marrakchi, 2009).

#### **1.6.10. Lavage**

Le but de cette étape est d'éliminer les taches d'huile et autres encore adhérentes à la boîte afin d'avoir une meilleure présentation du produit (Ababouch et El Marrakchi, 2009).

#### **1.6.11. Entreposage**

La meilleure température pour obtenir un entreposage adéquat se situe entre 15 et 20°C, à ces températures, les semi-conserves d'anchois gardent leurs caractéristiques originales pendant au moins une année. Généralement la technique des semi-conserves est basée sur l'inhibition de la flore pathogène quand elle existe et de la majorité de la flore d'altération (flore protéolytique) (Berkel et al., 2005).

### **1.7. Caractéristiques du produit fini**

La maturation est caractérisée par deux phénomènes. Le premier est rapide et caractérisé par une pénétration rapide du sel et une sortie d'eau à partir des muscles jusqu'à ce qu'un équilibre

isotonique et une partie des graisses qui se forment à la surface des anchois avec la saumure est éliminée (Ababouch et El Marrakchi, 2009).

Le deuxième phénomène est plus lent, durant lequel on observe des modifications lentes et progressives qui aboutissent à l'obtention d'un produit avec un goût spécifique (Ababouch et El Marrakchi, 2009).

### **1.7.1. Modifications physico-chimiques**

Après 3 à 4 mois de maturation, le pH musculaire est diminué de 6,0 à 5,4 qui est dû à l'accumulation d'acides gras libres, donc l'augmentation du pH au début de la maturation signifierait une évolution anormale du poisson anchoité ;

La diminution de l'activité de l'eau ( $a_w$ ) de 0,99 à 0,81 qui s'explique par la première pénétration du sel pendant le pré-salage. Après 24 heures de maturation l' $a_w$  est diminuée jusqu'à 0,79, et après trois mois, elle se stabilise à 0,76 ;

Le taux d'humidité de l'anchois est diminué de 75 % (anchois frais) à environ de 50 % après 2 à 3 semaines de maturation, et reste stable à ce pourcentage jusqu'à l'obtention du produit final;

Les teneurs en chlorure évoluent parallèlement à l'humidité. Le taux du sel est augmenté de 0,15 à 17 % à la fin de maturation, ce qui est expliqué par la pénétration rapide du sel durant les étapes de l'anchoitage (Ababouch et El Marrakchi, 2009).

### **1.7.2. Modification microbiologique au cours de l'anchoitage**

La nature de la flore initiale du poisson qui est localisée dans différentes parties du corps (peau, branchies et tube digestif) dépend spécifiquement du lieu de capture et de l'alimentation. D'après des études réalisées sur des petits pélagiques et principalement les anchois de l'Atlantique marocain montrent que cette flore initiale est dominée par des bactéries à Gram négatif (Ababouch et El Marrakchi, 2009).

Après les étapes de l'anchoitage on observe le développement de la flore contenue dans le sel utilisé pendant le salage de l'anchois (le sel utilisé n'est pas stérile), la quantité et la qualité des microorganismes dépendent principalement de l'origine de sel ainsi que le sel solaire (obtenu par évaporation de l'eau de mer), qui contient dix fois plus de microorganismes que le sel gemme (par exemple sel du rocher). D'une façon générale, la flore du sel solaire est constituée essentiellement par les halophiles stricts tels que les *Halobacteriaceae*, suivis par les halotolérants (principalement les *Bacillus*), le reste étant constitué par les genres *Micrococcus* et *Sarcina* (Ababouch et El Marrakchi, 2009).

## 2. Microorganismes halotolérants et halophiles

### 2.1. Définitions

Les halophiles sont des organismes qui nécessitent des concentrations élevées en sel, plus de 0,2 M pour leur croissance, et qui ont la capacité de résister aux effets du stress osmotique. Les halophiles se trouvent dans presque tous les grands domaines microbiens. Ils sont classés en fonction de leur exigence en NaCl (Dassarma et *al.*, 2010).

D'autre part les halotolérants sont des organismes qui sont capables de pousser dans des milieux à haute salinité, cependant ils peuvent également s'accroître en l'absence de sel, et dont la concentration optimale de sel de croissance est relativement faible (Anton, 2014). Ceux qui sont capables de se développer approximativement au-dessus de 15% (p/v) (2.5M) de NaCl sont considérés comme extrêmement halotolérants (Oren, 2006; Agwua et Oluwagunkeb, 2014).

Selon la classification de Kushner (1993) (tableau 2), faite en fonction de leur réponse au NaCl, en se basant sur leur croissance maximale, les halophiles se répartissent entre cinq catégories différentes.

**Tableau 2:** Classification des halotolérants et halophiles (Kushner, 1993).

Catégories	NaCl (% p/v)
Non-halophile	moins de 1%
Halophile léger	1-3%
Halophile modéré	3-15%
Halophiles à bord extrême	9-23%
Halophiles extrêmes	15-32%

### 2.2. Diversité phylogénétique des halotolérants et halophiles

Les halophiles se trouvent dans les trois domaines de la vie: *Archaea*, *Bacteria* et *Eukarya*. La majorité des halophiles sont répandues dans le règne bactérien à savoir les phyla des *Cyanobactéries*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobactéries*, *Spirochètes* et *Bacteroidetes*. L'augmentation de la salinité s'accompagne d'une réduction de la diversité des communautés microbiennes. La dépendance et la tolérance au sel sont des caractéristiques phénotypiques généralement comprises dans la «taxonomie polyphasique» des micro-organismes nouvellement découverts (Oren, 2002; Oren 2008).

Le plus grand nombre d'espèces halophiles est classé dans la famille des *Halomonadaceae*. On peut citer dix genres de bactéries halophiles et halotolérantes: *Aidingimonas* (une espèce), *Carnimonas* (une espèce), *Chromohalobacter* (neuf espèces), *Cobetia* (deux espèces), *Halomonas* (quatre-vingt espèces), *Kushneria* (cinq espèces), *Modicisalibacter* (une espèce) et *Salinicola* (trois espèces); ainsi que deux genres de bactéries non-halophiles: *Halotalea* (une espèce) et *Zymobacter* (une espèce) (Tahrioui et al., 2013).

Un bon nombre de bactéries halotolérantes a été également isolé. Elles appartiennent à plusieurs genres, tels que *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus Oceanobacillus*, *Virgibacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Micrococcus*, *Myxococcus* et *Pediococcus* (Agwua et Oluwagunke, 2014 ; Antòn, 2014).

### 2.3. Adaptation aux milieux salés

La salinité affecte fortement les organismes aquatiques, certaines bactéries halotolérantes présentent certains changements morphologiques lorsque la salinité augmente au-dessus de 5% et d'autres augmentations empêchent la reproduction. En outre, la diversité microbienne est connue pour se diminuer avec l'augmentation de la salinité. Par conséquent, ces microorganismes utilisent deux stratégies fondamentalement différentes pour équilibrer leur cytoplasme osmotique avec leur milieu. Les halophiles et halotolérants ont des propriétés cellulaires qui nécessitent des adaptations métaboliques et structurelles afin de résister au stress hyper-osmotique (Truper et al., 1991; Oren, 2008 ; Agwua et Oluwagunke, 2014).

#### 2.3.1. Accumulation de KCl

Dans cette stratégie les ions de potassium ( $K^+$ ) sont accumulés dans le cytoplasme pour équilibrer la pression osmotique de leur milieu, avec son contre ion  $Cl^-$ . elle est surtout connue chez les archées extrêmement halophiles de la famille *halobacteriaceae*, et chez des espèces telles que *Halobacterium salinarum* et *Haloarcula marismortui*, aussi chez des bactéries fermentatives et anaérobies acétogènes comme *Halanaerobium* et *Acetohalobium* (Kunte et al., 2002 ; Oren, 2008).

Cette stratégie requiert une adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire. Les protéines à des concentrations de sel presque saturées doivent conserver leur conformation et leur activité appropriées. Le protéome de ces organismes est très acide, et lorsque la teneur en sel est faible, la plupart des protéines sont dénaturées. Donc ces microorganismes ne peuvent pas survivre dans des milieux de faibles teneurs en sel, ces protéines halophiles en raison du nombre d'acides aminés acides présents sur leur surface lient des quantités importantes de sel et de l'eau (Oren, 2008 ; Dalmaso et al., 2015).

### 2.3.2. Biosynthèse et/ou accumulation de solutés compatibles

Cette stratégie consiste à exclure le sel du cytoplasme, et à accumuler des solutés organiques qui peuvent être soit synthétisés par la cellule ou transportés à l'intérieur de la cellule à partir du milieu, afin d'assurer l'équilibre osmotique, elle est adoptée par les membres du domaine *Bacteria*. Les microorganismes qui utilisent cette stratégie peuvent souvent s'adapter à un large éventail de concentrations en sel, en règle générale, les bactéries et les eucaryotes accumulent habituellement des solutés compatibles neutres, tandis que les *Archaea* préfèrent les solutés chargés négativement (Aissaoui, 2013).

L'accumulation de ces solutés ne gêne pas l'activité enzymatique. En réponse à un stress osmotique, une variété de solutés organiques est accumulée par ces organismes, y compris la glycine, la bétaine, l'éctoïne et d'autres dérivés d'acides aminés, des sucres et des alcools de sucre (Oren, 2008; Dalmaso et al., 2015).

### 3. Potentiel biotechnologique des enzymes halotolérantes et halophiles

Les enzymes sont des protéines présentes dans toutes les cellules, ils sont considérées comme de catalyseurs c'est-à-dire qu'en agissant à des concentrations très faibles, elles augmentent la vitesse des réactions chimiques, donc diminue l'énergie et sans en modifier les résultats (Eed, 2013).

Les halophiles et les halotolérants ont émergé comme un vaste dépôt de nouvelles enzymes au cours des dernières années (Kumar et al., 2012). Elles sont capables de survivre et de fonctionner dans des conditions défavorables dont une concentration saline élevée. La plupart de ces enzymes sont inactivés et dénaturés à des concentrations inférieures à 1 M de NaCl (Margesin et Schinner, 2001; Nwagu et Okolo, 2011; Uzyol et al., 2011).

Les microorganismes qui se développent dans des conditions extrêmes sont considérés comme une source importante d'enzymes stables et de grande valeur. Ces dernières appelées parfois «Extrêmozymes» sont une source nouvelle de catalyseurs intéressants pour l'industrie. Une partie de ces extrêmozymes peuvent être polyextrémophiles (Karan et al., 2012). Ces enzymes sont généralement de type hydrolases. Elles sont capables de décomposer différents polymères, constituent un groupe à haut intérêt biotechnologique : des amylases, des lipases, des DNases et des protéases produites par plusieurs bactéries halophiles et halotolérantes isolées de plusieurs habitats salins ont été rapportées, certaines montrent une forte dépendance au sel pour leur activité et plusieurs d'entre elles sont thermotolérantes et alcaliphiles (Kamekura et Onishi, 1974 ; Mevarech et al., 2000 ; Amoozegar et al., 2003 ; Sánchez-Porro et al., 2003 ; Moreno et al., 2009).

Ces propriétés rendraient ces enzymes attrayantes pour différentes applications biotechnologiques puisqu'elles seraient capables de catalyser des réactions dans des conditions difficiles, spécifiques à de nombreux processus industriels.

### 3.1. Amylases

Parmi ces enzymes on trouve les amylases qui sont des enzymes extracellulaires appartenant à la classe d'hydrolases qui catalysent la dégradation des polymères d'amidon et en fonction du type d'amylase, l'amidon est dégradé en sucre simple tels que le glucose, le maltose ou à des oligosaccharides, malto-oligosaccharides ou des dextrans, et finalement obtenir des unités de glucose (Setati, 2010; Anupama et Jayaraman, 2011; Nwagu et Okolo, 2011, Sundarram et Murthy 2014).

Toutes les enzymes ont des paramètres optimales (température, pH, concentration de sel, temps d'incubation, etc.), dans les quelles l'activité de ces enzymes est maximale et donne des rendements élevés, et chaque enzyme a son propre paramètre selon les origines (selon le microorganisme qui le produit) par exemple les alpha-amylases produites par *Bacillus* sp. AB68 présentent une meilleure activité dans un intervalle de pH de 6,0 à 11,5 et une température de 50°C (Aygan et al., 2008).

La caractéristique principale de ces amylases est la stabilité de ces enzymes dans des concentrations élevées de sel, parmi les bactéries halotolérantes productrices des amylases extracellulaires, on peut citer: *Bacillus aquimaris* VITP4; *Halobacillus* sp. ; *Bacillus halodurans* ; *Bacillus* sp. TSCVKK ; *Chromohalobacter* sp. TVSP101 ; *Rheinheimera aquimaris* ; *Micrococcus* sp. ; *Rhodothermus marinus* ; *Nesterenkonia* sp. F (Ventosa et al., 1998 ; Mageswari et al., 2012 ; Biswas et Paul, 2014).

Ces enzymes ont une gamme étendue d'applications dans beaucoup de champs tels que les industries de textile, de boulangerie, de brassage, de distillation (Gupta et al., 2003), du sucre et de produits pharmaceutiques (Saxena et al., 2007) et les industries des détergents, du papier et alimentaire comme aromatisants (Margesin et Schiner, 2001).

### 3.2. Pectinases

Les polygalacturonases, aussi appelées pectinases, sont des hydrolases se divisant en deux sous-groupes, les endopolygalacturonases (E.C.3.2.1.15) et les exopolygalacturonases (E.C.3.2.1.67). Ces deux sous-groupes sont divisés selon leur mode d'action sur le substrat, soit une hydrolyse interne ou externe (Blanco et al., 1998; Gainvors et al., 2000).

Ces enzymes sont produits et sécrétées par divers microorganismes tels que certaines bactéries, levures et champignons. Elles peuvent être utilisées en agro-alimentaire pour la clarification du jus, dans l'industrie du textile pour l'assouplissement des fibres et dans l'industrie des pâtes et papiers, dans les additifs alimentaires à base de volaille, dans l'extraction de l'huile végétale et les fermentations du thé et café (Jayani *et al.*, 2005).

Actuellement, les plus importants candidats halophiles producteurs de pectinases extracellulaires appartiennent aux genres : *Bacillus*, *Staphylococcus* et *Pseudomonas* (Geetha *et al.*, 2012 ; Venkata Naga raju et Divakar, 2013 ; Rokade *et al.*, 2015).

### 3.3. Protéases

Les protéases représentent l'un des plus grands groupes d'enzymes utilisées dans l'industrie et représentent 60% du total de la vente dans le monde entier (Aissaoui, 2013).

Elles sont intensivement étudiées et largement appliquées dans des processus industriels comme additifs de détergents, dans la transformation des produits alimentaires, dans l'industrie pharmaceutique, du cuir et dans la transformation des déchets (Amoozegar *et al.*, 2007 ; Karbalaei-Heidari *et al.*, 2009).

Ces enzymes ont également été isolées et caractérisées de plusieurs espèces bactériennes comprenant *Pseudoaltermonas* sp. (Sánchez-Porro *et al.*, 2003), *Bacillus* sp. (Setyorini *et al.*, 2006; Shivanand et Jayaraman, 2009), *Salinivibrio* sp. (Amoozegar *et al.*, 2007), *Salicola* sp. (Moreno *et al.*, 2009), *Halobacillus* spp. (Karbalaei-Heidari *et al.*, 2009), *Filobacillus* sp. (Hiraga *et al.*, 2005), *Chromohalobacter* sp. (Vidyasagar *et al.*, 2009), *Nesterenkonia* sp. (Bakhtiar *et al.*, 2005) et *Virgibacillus* sp. (Sinsuwan *et al.*, 2008).

Les protéases halophiles ont une activité optimale en présence de NaCl et maintiennent leur stabilité dans un intervalle de pH allant de 5 à 10. Aussi il a été rapporté que ces enzymes sont actives à des températures de 40 à 75°C (Setati, 2010).

### 3.4. Lipases et Estérases

Les enzymes lipolytiques, Estérases (EC 3.1.1.1) et lipases (EC 3.1.1.3), ont été reconnues comme des biocatalyseurs qui réalisent des réactions nouvelles dans les deux milieux aqueux et non aqueux. Elles sont des hydrolases qui catalysent l'hydrolyse de triacycle du glycérol en glycérol et la synthèse à la fois à chaîne courte ( $\leq 10$ ) et à chaîne longue ( $\geq 10$ ) d'acylglycérols. par contre les estérases constituent une famille d'hydrolases qui catalysent l'hydrolyse et la formation d'esters à chaîne courte d'acides gras (Ghanem, 2007; Esteban, 2014).



Les enzymes lipolytiques sont très diversifiées dans leurs propriétés enzymatiques et la spécificité de substrat, ce qui les rend très attractifs pour les applications industrielles. Les lipases ont trouvé de multiples applications dans les industries médicales et agroalimentaires, utilisées lors de la réalisation des produits alimentaires fermentés, y compris les produits laitiers et carnés, elles doivent être actives en présence d'une concentration élevée en sel, d'où les enzymes halophiles ou halotolérantes sont recommandés. À ce jour, peu de recherches ont été entreprises en ce qui concerne les lipases halophiles et leurs applications dans les procédés industriels (Ghanem, 2007; Esteban, 2014).

Pour l'instant les études ont permis de révéler des activités lipolytiques chez les genres halophiles, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Salinivibrio* et *Staphylococcus* (Sánchez-Parro et al., 2003 ; Amoozegar et al., 2008), *Salimicrobium* sp. LY19, *Corynebacterium* (Jiang et al., 2012 ; Xin et Hui-Ying, 2013).

# *Matériels et méthodes*

Ce travail est réalisé au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie à l'université de Jijel pendant un mois et 15 jours dont le but est d'isoler et de purifier des souches halotolérantes en vue d'une recherche d'enzymes hydrolytiques.

### 1. Préparation d'anchois salés et séchés

Après avoir entêtés et éviscérés, les anchois sont mélangés avec du gros sel dans une cuve contenant des trous afin de prévenir le début d'altération de ce poisson. Les couches d'anchois sont alternées avec des couches de sel, dont la première et la dernière couche étant formée de sel. Le sel utilisé lors de cette opération est un sel de cuisine (Royal) et dont la composition en mg/kg est la suivante: NaCl, 99,50 ; Mg<sup>2+</sup>, 0,09 ; Ca<sup>2+</sup>, 0,06 ; H<sub>2</sub>O, 0,025 et NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 50,84). Après 10 mois de salage (du mois de juillet au mois d'avril) à température ambiante, les anchois sont séchés à l'air libre pendant 2 à 3 jours. Cette étape consiste à éliminer l'eau contenue dans les anchois préalablement salés et d'augmenter la durée de conservation puisque une fois on fait le séchage, le poisson peut se conserver car les bactéries et les enzymes ne peuvent pas se développer en l'absence de l'eau et ne peuvent donc plus provoquer la dégradation du poisson.

### 2. Isolement et purification des isolats

La préparation de la solution mère est effectuée à partir de la pesée de 1g d'échantillon d'anchois salé et séché broyé dans un mortier jusqu'à obtention d'une pâte et enfin dilué dans 9 ml de Peptone-Sel stérile (annexe).

L'isolement des souches microbiennes halophiles est effectué sur le milieu HM (Halophilic Medium) de Torreblancaet *al.*, (1986) composé de 5g d'extrait de levure et 5g de peptone et à deux concentrations salines (5%, 10%, p/v), préparées à partir d'une solution saline à 30 % (p/v) selon la composition de Subov (1931): NaCl, 234g; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 42g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 60g; KCl, 6g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1g; NaBr, 0,7g; NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 g; FeCl<sub>3</sub>, 0,005g et complété à 1000 mL avec de l'eau distillée. C'est un milieu complet qui contient tous les composants nécessaires à cette catégorie de microorganismes.

Les milieux de culture solides sont obtenus par addition de 22g d'agar-agar. Le pH du milieu est ajusté à 7,2±0,2 à l'aide d'une solution de NaOH 4M. Ces milieux ont servi à la fois pour l'isolement, et aussi de base pour les différents tests réalisés. 0,1 ml de la solution mère est étalé sur le milieu solide ensuite les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C jusqu'à apparition de colonies (pendent cinq jour). Les colonies à différents aspects macroscopiques sont sélectionnées et purifiées par repiquage successifs sur milieu à 0% (p/v) de sel.

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

#### 3.1. 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. Donc, 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.

#### 3.2. Examen microscopique

##### 3.2.1. 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 Gram positif se colorent en violet alors que les Gram négatif se colorent en rose.

##### 3.2.2. Coloration des spores auvert de Malachite

Elle permet la mise en évidence des spores qui se colorent en vert alors que le corps cellulaire se colore en rose selon la technique suivante :

- Faire un frottis des bactéries sur une lame propre et sèche ;
- Sécher le frottis ;
- Fixer à l'alcool puis rincé à l'eau, ou à la flamme en passant trois fois dans la flamme (ou au-dessus du bec) ;
- Colorer avec une solution de vert Malachite à 5% pendant 10 min;

- Rincer à l'eau distillée ;
- Colorer à la safranine ou au mercurochrome à 5% pendant 1 min ;
- Rincer à l'eau distillée ;
- Sécher.
- Observer le frottis à l'immersion (objectif  $\times 100$ ) (Solomon et Viswalingam, 2013).

#### 4. Caractérisation physiologique des isolats

L'influence de la salinité, de la température et du pH sur la croissance, est déterminée en variant un des paramètres alors que les deux autres sont maintenus constants (Joshi *et al.*, 2008).

##### 4.1. 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  $7,2 \pm 0,2$ .

##### 4.2. pH

L'intervalle de pH de croissance a été déterminé par ensemencement des milieux gélosés sur une gamme s'étalant de : 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0.

##### 4.3. Température

L'incubation des milieux solides à pH  $7,2 \pm 0,2$  ensemencés a lieu à 20; 30; 37; 40 et 50°C.

#### 5. Caractérisation biochimique des isolats

##### 5.1. 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).

##### 5.2. 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).



### 5.3. 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).

### 5.4. 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 Moeller 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).

### 5.5. 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).

### 5.6. 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 pique 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 pique 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.

### **5.7. 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).

### **5.8. 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.

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).

### **5.9. 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.

### 5.10. 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 (Guiraud, 1998).

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.

### 5.11. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

La production d'hydrolases extracellulaires est recherchée qualitativement sur milieu solide modifié par réduction de la quantité d'extrait de levure et de peptone à 0,3 g/L (milieu de base) et par rajout de polymère-test (Oren et *al.*, 1997).

#### 5.11.1. 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.

#### 5.11.2. 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



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.

#### **5.11.2. 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.

#### **5.11.3. 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).

#### **5.11.4. 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.

# *Résultats et discussion*

### 1-Isolement et purification des isolats

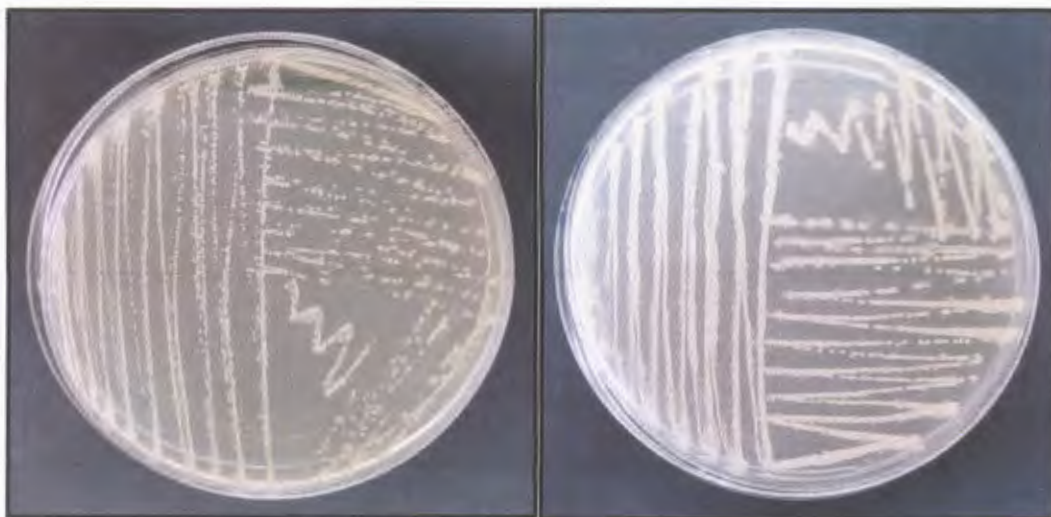
Dix-huit souches ont été retenues pour une caractérisation morphologique, physiologique et biochimique. Elles sont désignées selon un code composé de deux lettres et d'un numéro.

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

La caractérisation macroscopique et microscopique des souches figure dans le tableau 3.

#### 2.1. Examen macroscopique

La moitié des souches forment sur milieux solides des colonies beiges à surface lisse, plates, circulaires, à bords réguliers et dont le diamètre varie de 1 à 2 mm. Neuf isolats donnent des colonies pigmentées entre le jaune et l'orange. Les souches AC5, AC8, AC9 forment des colonies irrégulières (figure 2).

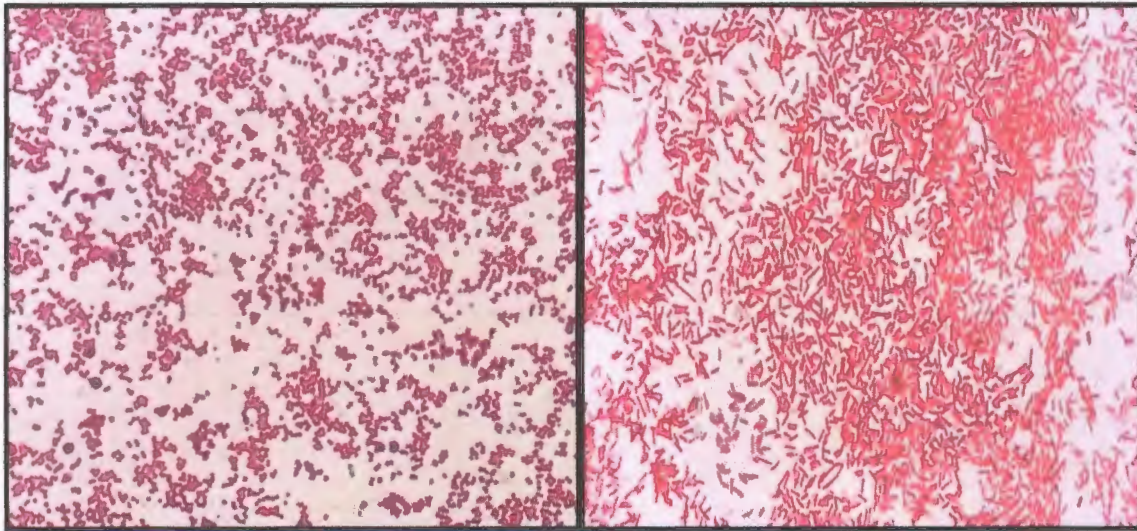


**Figure 2** : Exemples d'aspects macroscopiques des isolats cultivés sur le milieu HM. À droite, souche AC 3. À gauche, souche AC 14. Photos prises avec un appareil photo numérique LG (zoom x2).

#### 2.2. Examen microscopique

La coloration de Gram a révélé une dominance des coccobacilles à Gram négatif, à extrémités arrondies et souvent isolés. Quant aux formes coccoidales et bacillaires sont observées chez 7 et 4 souches, respectivement (figure 3).

Selon la coloration des spores au vert de malachite, aucune souche n'est sporulée.



**Figure 3 :** Exemples d'observations microscopiques de la coloration de Gram à l'immersion (x100). À droite, souche 9. À gauche, souche 13. Photos prises avec un appareil photo numérique LG (zoom x2,5).

**Tableau 3:** Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies.

Souches	Morphologie des colonies	Pigmentation	Gram	Morphologie cellulaire	Mode de regroupement
AC1	Ronde convexe	Orange claire	-	Coccobacilles	Isolés et groupée en deux
AC2	Ronde convexe	Orange	-	Coccobacilles	Isolés et groupée en deux
AC3	Ronde plate	Beige	-	Bacilles	Isolés
AC4	Ronde convexe	Jaune	-	Cocci	Isolés et diplocoques
AC5	Irrégulière convexe	Transparente avec un centre beige	-	Bacilles fins	Isolés
AC6	Ronde plate	Beige	-	Coccobacilles	Isolés
AC7	Ronde plate	Beige	-	Coccobacilles	Isolés
AC8	Irrégulière plate	Beige	+	Bacilles fins	Isolés et diplobacilles
AC9	Irrégulière plate	Beige	-	Bacilles fins	Isolés et diplobacilles
AC10	Ronde plate	Beige	-	Cocci	Isolés
AC11	Ronde plate	Jaune	-	Coccobacilles	Isolés
AC12	Ronde plate	Orange	-	Coccobacilles	Isolés

**Tableau 3:** Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies (suite).

Souches	Forme	Pigmentation	Gram	Morphologie cellulaire	Mode de regroupement
AC13	Ronde plate	Orange	+	Cocci	Diplocoque et en amas
AC14	Ronde plate	Beige	+	Cocci	Isolés
AC15	Ronde plate	Beige	+	Coccobacilles	Isolés
AC16	Ronde convexe	Jaune	-	Cocci	Isolés
AC17	Ronde convexe	Jaune foncé	-	Cocci	Isolés
AC18	Ronde plate	Orange foncé	-	Cocci	Isolés, diplocoques et en amas

AC : Anchois.

### 3. Caractérisation physiologique des isolats

Les résultats de la caractérisation physiologique des isolats sont rassemblés dans le tableau 4.

#### 3.1. Salinité

L'ensemble des souches isolées peuvent croître en absence qu'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). Une seule souche est capable de croître sur des milieux de culture dont la concentration saline finale peut atteindre jusqu'à 15% (p/v). Ces isolats présentent un optimum de croissance à 0% (p/v) de sel.

#### 3.2. Température

La gamme de température explorée varie de 20 à 50°C. La plupart des souches sont capables de croître dans la gamme allant de 20 à 40°C. Deux souches (AC5 et AC9) se développent à une température allant jusqu'à 50°C. La température optimale de croissance de l'ensemble des isolats est située entre 20 et 37°C. Il s'agit donc de souches mésophiles (Mégraud, 2011).

#### 3.3. pH

L'intervalle de pH permettant la croissance de l'ensemble des souches se situe entre 5,0 et 10. Cependant cinq isolats sont incapables de croître à pH 10, l'intervalle le plus étroit est observé chez deux souches (AC1 et AC2). L'optimum de croissance pour toutes les souches est situé entre 6 et 7.

**Tableau 4:** Caractérisation physiologique des isolats (salinité, pH et température).

Souche	Salinité (%) (p/v)		pH		Température (°C)	
	Gamme	Optimum	Gamme	Optimum	Intervalle	Optimum
AC1	0,0-12,5	0,0	5,0-8,0	6,0-7,0	20,0-40,0	20,0-37,0
AC2	0,0-10,0	0,0	5,0-8,0	6,0-7,0	20,0-40,0	20,0-37,0
AC3	0,0-10,0	0,0	5,0-10,0	6,0-7,0	20,0-40,0	20,0-37,0
AC4	0,0-10,0	0,0	5,0-10,0	6,0-7,0	20,0-40,0	20,0-37,0
AC5	0,0-12,5	0,0	5,0-10,0	6,0-7,0	20,0-50,0	20,0-37,0
AC6	0,0-12,5	0,0	5,0-10,0	6,0-7,0	20,0-40,0	20,0-37,0
AC7	0,0-12,5	0,0	5,0-10,0	6,0-7,0	20,0-40,0	20,0-37,0
AC8	0,0-12,5	0,0	5,0-10,0	6,0-7,0	20,0-40,0	20,0-37,0
AC9	0,0-12,5	0,0	5,0-10,0	6,0-7,0	20,0-50,0	20,0-37,0
AC10	0,0-10,0	0,0	5,0-10,0	6,0-7,0	20,0-40,0	20,0-37,0
AC11	0,0-10,0	0,0	5,0-9,0	6,0-7,0	20,0-40,0	20,0-37,0
AC12	0,0-10,0	0,0	5,0-10,0	6,0-7,0	20,0-40,0	20,0-37,0
AC13	0,0-10,0	0,0	5,0-10,0	6,0-7,0	20,0-40,0	20,0-37,0
AC14	0,0-10,0	0,0	5,0-10,0	6,0-7,0	20,0-40,0	20,0-37,0
AC15	0,0-15,0	0,0	5,0-9,0	6,0-7,0	20,0-40,0	20,0-37,0
AC16	0,0-10,0	0,0	5,0-9,0	6,0-7,0	20,0-37,0	20,0-30,0
AC17	0,0-10,0	0,0	5,0-10,0	6,0-7,0	20,0-37,0	20,0-30,0
AC18	0,0-10,0	0,0	6,0-10,0	6,0-7,0	20,0-40,0	20,0-37,0

#### 4. Caractérisation biochimique des isolats

Les résultats de la caractérisation biochimique sont résumés dans le tableau 5.

##### 4.1. Recherche de la catalase

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

#### **4.2. Utilisation de citrate sur le milieu au citrate de Simmons**

La capacité de croître sur le citrate comme unique source de carbone et d'énergie est observée avec 3 souches uniquement (AC3, AC5 et AC17).

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

Sur les 18 souches testées pour la production de la  $\beta$ -galactosidase, enzyme responsable de la dégradation du lactose en glucose et galactose, 5 se sont révélées positives pour ce test.

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

Dans cette étude tous les isolats possèdent une ADH, tandis que, les enzymes LDC et ODC sont présents seulement chez 10 souches (AC1 à AC10).

La plupart des souches produisent l'ADH et 6 souches sur 10 possèdent les trois types d'enzymes.

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

Les résultats de la croissance sur le milieu TSI, ont montré que les mêmes souches qui oxydent le lactose et/ou le saccharose, fermentent le glucose sans dégagement de gaz. Il n'y a aucune production d'H<sub>2</sub>S.

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

La plupart des souches fermentent le mannitol et 7 isolats sont mobiles.

#### **4.7. Production d'indole**

Toutes les souches ne possèdent pas la tryptophanase qui est responsable de la production d'indole.

#### **4.8. 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 et celle d'acétoïne révélée par les réactifs VP1 et VP2, sont généralement faibles. Cependant, 6 souches ont la capacité de produire les acides mixtes et 3 souches ont la capacité de produire d'acétoïnes (AC1, AC10 et AC13).

#### **4.9. Recherche de l'uréase**

Toutes les souches sont uréase négatives.

#### 4.10. Recherche du nitrate réductase

Une seule souche (AC5) possède le nitrate réductase.

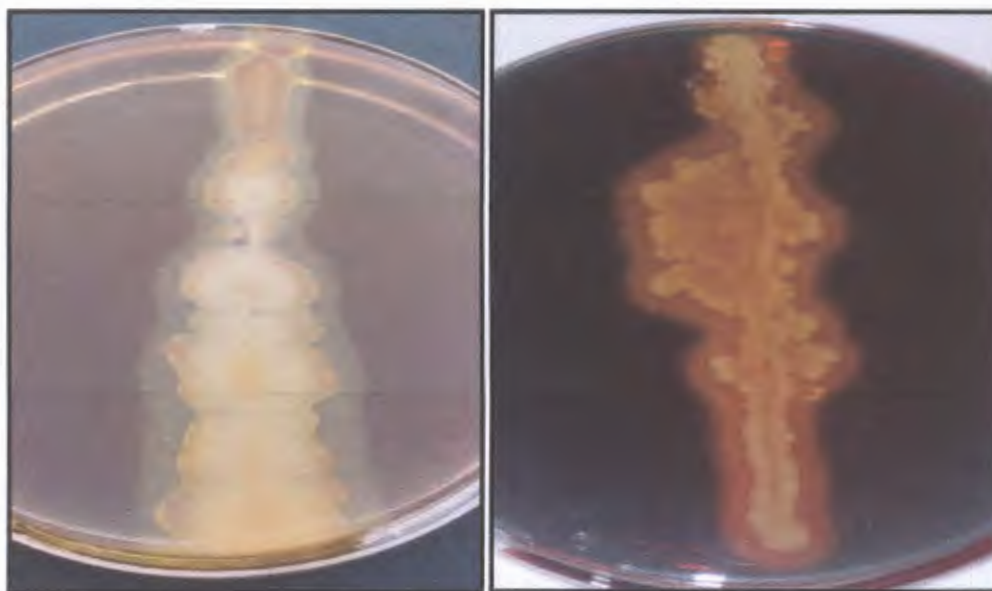
#### 4.11. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

Les activités amylolytique, pectinolytique, protéolytique et lipolytique ont été mises en évidence en utilisant respectivement 6 substrats différents : amidon, pectine, caséine, huile d'olive, Tween 80 et Tween 20, respectivement.

Tous les isolats sont producteurs d'enzymes hydrolytiques extracellulaires avec une prédominance de l'activité protéolytique dont le substrat test est la caséine (15 souches). Un exemple d'hydrolyse de l'amidon et de la pectine est représenté par la figure 4. L'activité amylolytique est observée chez 10 souches tandis que 3 isolats uniquement sont capables de dégrader la pectine.

L'hydrolyse des Tweens 20 et 80 est observé chez 14 et 4 souches, respectivement, par contre une seule souche est capable d'hydrolyser l'huile d'olive (AC14).

Il faut noter que des activités hydrolytiques extracellulaires combinées ont été observées chez 16 isolats dont les souches AC5, AC9 et AC11 possèdent quatre activités hydrolytiques différentes.



**Figure 4 :** Exemples d'activités hydrolytiques. À droite, hydrolyse de l'amidon, souche AC5. À gauche, hydrolyse de la pectine, souche 9. Photos prises avec un appareil photo numérique LG (zoom numérique x2).



Tableau 5: Caractérisation biochimique des isolats.

Souches	Catalase	Citrate de Simmons	Glucose	Lac et/ou sac	H <sub>2</sub> S	Gaz	Mannitol	Mobilité	Production d'indole	Nitrate réductase	VP	RM	ADH	LDC	ODC	$\beta$ -galactosidase	Uréase	Amylase	Pectinase	Caséinase	Hydrolyse de l'huile d'olive	Hydrolyse de Tween 80	Hydrolyse de Tween 20
AC1	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
AC2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
AC3	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
AC4	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
AC5	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
AC6	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
AC7	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
AC8	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
AC9	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
AC10	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Tableau 5: Caractérisation biochimique des isolats (suite).

Souches	Catalase	Citrate de Simmons	Glucose	Lac et/ou sac	H <sub>2</sub> S	Gaz	Mannitol	Mobilité	Production d'indole	Nitrate réductase	VP	RM	ADH	LDC	ODC	β-galactosidase	Uréase	Amylase	Pectinase	Caséinase	Hydrolyse de l'huile d'olive	Hydrolyse de Tween 80	Hydrolyse de Tween 20
AC11	+	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	nd	nd	+	-	tr	-	+	-	+	+
AC12	+	-	+	+	-	-	tr	-	-	-	-	-	tr	nd	nd	-	-	+	tr	+	-	-	-
AC13	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	nd	nd	-	-	-	-	+	-	-	-
AC14	+	-	+	+	-	-	tr	+	-	-	-	tr	+	nd	nd	-	-	-	-	+	+	-	+
AC15	+	-	+	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	-	-	-	-	+	-	+	+
AC16	+	-	+	+	-	-	tr	-	-	-	-	-	tr	nd	nd	-	-	tr	-	-	-	-	-
AC17	+	+	+	+	-	-	tr	+	-	-	-	-	-	nd	nd	+	-	tr	-	+	-	-	-
AC18	+	-	-	-	-	-	tr	+	-	-	-	-	+	nd	nd	-	-	tr	-	-	-	-	tr

AC : Anchois, + : Réaction positive, - : Réaction négative, f, réaction faible; nd, non déterminé.

## 5. 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.

Ce travail a permis l'isolement de 18 souches, hétérotrophes dont la majorité se présente sous forme coccobacillaire à Gram négatif souvent isolés. Ces isolats forment sur milieux solides des colonies beiges et pigmentées entre le jaune et l'orange.

L'ensemble des souches isolées sont halotolérantes extrêmes (Kushner, 1993). Elles tolèrent des concentrations salines finales allant jusqu'à 10% (p/v). Six souches ont la capacité de croître à une gamme de salinité de 0 à 12.5% (p/v) et une seule (AC5) de 0 à 15% (p/v).

Une croissance optimale de l'ensemble des isolats est observée à un intervalle de pH variant de 6 à 7 et à une gamme de température allant de 20 à 37°C. Ce sont donc des neutrophiles et des mésophiles, respectivement (Mégraud, 2011).

L'ensemble des souches sont catalase positives, ce sont donc des aérobies ou anaérobies facultatives. Aucune n'est capable de produire l'indole. L'absence de cette enzyme est fréquente chez ce type de microorganismes (Grant et al., 2001; Fan et al., 2004; Chen et al., 2008; Peng et al., 2009). Trois souches uniquement (AC3, AC5 et AC17) ont la capacité de croître sur le citrate comme unique source de carbone et d'énergie.

Sur les 18 souches testées pour la production de la  $\beta$ -galactosidase, enzyme responsable de la dégradation du lactose en glucose et galactose, cinq se sont révélées positives pour ce test, tandis que la plupart des souches produisent l'ADH et 6 souches sur 10 possèdent les trois types d'enzymes (ADH, LDC et ODC). Toutes les souches sont uréase négatives et une seule (AC5) possède le nitrate réductase.

Les souches qui oxydent le lactose et/ou le saccharose, fermentent le glucose. Cependant il y a absence de production de H<sub>2</sub>S et de gaz. La plupart des souches sont immobiles et capables de fermenter le mannitol. Quelques souches uniquement ont la capacité de produire les acides mixtes ou les acétoïnes. Généralement, c'est le cas de la majorité des microorganismes halophiles aérobies et membres des familles *Bacillaceae* et *Halomonadaceae* (Arahal et al., 2007; De la Haba et al., 2011).

Tous les isolats obtenus sont producteurs d'enzymes hydrolytiques extracellulaires. Ils sont dotés, principalement, d'une activité protéolytique, lipolytique et amylolytique. L'activité hydrolytique la plus abondante est celle de la dégradation de la caséine (15 isolats sur 18).

Ces résultats sont en accord avec l'étude de Taprig *et al.* (2013) dans laquelle 17 aliments salés fermentés (dont la majorité sont des poissons) ont fait l'objet d'un criblage et une caractérisation de bactéries halophiles productrices de protéases extracellulaires. Ces dernières ont été produites avec une grande quantité (3,51-3,62 unités/mg de protéine) par des bactéries appartenant principalement aux genres *Virgibacillus* et *Halobacillus*. D'autres études ont montré que les protéases issues des bactéries halotolérantes et halophiles présentent une activité optimale en présence de 3% à 25% de NaCl, un pH de 8 à 11 et à des températures comprises entre 40 et 60°C. À l'exception de *Virgibacillus* sp. SK33 qui produit une protéase avec un optimum de pH à 7,5. Indiquant que la majeure partie des protéases halo-bactérienne présente aussi des caractéristiques d'alcaliphilie. Ces propriétés rendent ces protéases appropriées pour être utilisées dans l'industrie des détergents (Sinsuwan *et al.*, 2009).

Les productions de protéases halophiles recombinantes ont été aussi réalisées dans un nombre limité d'études. Le gène rapT a été cloné pour produire une protéase, et la structure tridimensionnelle d'une protéase alcaline extracellulaire résistante au dodécylsulfate de sodium (SDS) (vapT) de *Vibrio metschnikovii* souche RH530 a été caractérisée (Kwon *et al.*, 1995). Récemment Karan *et al.* (2012) ont cloné et séquencé un gène d'une sérine protéase halophile isolée de *Geomicrobium* sp. EMB2.

L'hydrolyse de tween 20 par les souches obtenues est également importante (14 isolats). Pour le reste des activités, celle de la dégradation de l'huile d'olive est la plus faible (un seul isolat). Il n'y a pas tant d'exemples d'estérases halophiles, particulièrement les lipases produites par des bactéries. L'activité lipolytique a été rapportée chez des souches de *Bacillus halodurans*, *Bacillus alcalophilus* et *Bacillus licheniformis* (Vargas *et al.*, 2004). *Salinivibrio* SA-2, peut produire une lipase extracellulaire avec une activité optimale à une concentration de sel, de pH et de température de, 0.5M de NaCl, pH 7.5 et 50°C, respectivement (Amoozegar *et al.*, 2008). Il y a aussi quelques études moléculaires sur la production des lipases halophiles. Par exemple, Une lipase et une protéine activatrice de lipase de *Vibrio vulnificus* CKM-1 ont été clonées et caractérisées (Su *et al.*, 2004). Une enzyme lipolytique a été isolée de la bactérie halophile *Micrococcus lipolyticus*.

L'activité amylolytique est aussi importante (10 isolats). Les nombreuses études de caractérisation des amylases d'halophiles, ont montré que ces 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). Elles pourraient donc être utilisées dans des processus durs d'industries de détergents et d'hydrolyse d'amidon (Karan *et al.*, 2012).

Le pH optimum de l'activité enzymatique varie de 6.5 à 7.5 avec quelques exceptions. Le pH optimum de *Salimicrobium halophilum* souche LY20, *Thalassobacillus* sp. LY18 et *Chromohalobacter* sp. TVSP 101 apparait à pH 9 et encore plus (Prakash *et al.*, 2009; Li et Yu 2011; 2012). Par ailleurs, *Marinobacter* sp. EMB8 tolère jusqu'à un pH de 11 (Chakraborty *et al.*, 2009 ; Kumar et Khare, 2012). La température optimale des amylases halophiles varie entre 45°C-65°C. En revanche, *Marinobacter* sp. EMB8 présente une activité à 80°C, qui est une température relativement élevée pour des bactéries halophiles. Le poids moléculaire des amylases isolées de bactéries halophiles varie de 31 kDa pour *Thalassobacillus* sp. LY18 à 100 kDa pour *Nesterenkonia* sp. souche F. Cependant le poids moléculaire du reste varie entre 50 kDa et 65 kDa.

Les productions recombinantes d'amylases halophiles sont aussi réalisées. Le gène d'amylase, AmyA, de *Halothermothrix orenii* a été cloné, surexprimé et purifié. Les résultats ont montré que l'enzyme recombinante peut tolérer jusqu'à 25 % de NaCl, bien que l'optimum est observé à 5 % de NaCl (Mijts et Patel, 2002).

L'activité pectinolytique est très faible, trois isolats producteurs, seulement. Peu de pectinases ont été isolées de bactéries halophiles et surtout de celles halotolérantes. Une étude réalisée par Delgado *et al.* (2014) a permis l'isolement de pectinases de bactéries halophiles appartenant aux espèces, *Salinicoccus roseus* (EC-01), *Bacillus pumilus* (CP-01), *Bacillus atrophaeus* (PN-01) et *Bacillus atrophaeus* (SY-01).

Des activités hydrolytiques combinées sont également observées chez la majorité des isolats, ce qui révèle un véritable atout biotechnologique. Il faut noter que cinq souches sont capables de produire deux activités hydrolytiques différentes, six possèdent trois hydrolases et trois ont la capacité de produire quatre enzymes différentes. La présence de telle combinaison chez les halophiles a été rapportée par de nombreuses études réalisées sur de différents milieux salins et hypersalins (eaux, sols, aliments). Ces résultats sont en accords avec ceux de nombreux auteurs (Sánchez-Porro *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2007; Rohban *et al.*, 2009 ; Taprig *et al.*, 2013).

*Conclusion*  
*et perspectives*

L'objectif essentiel de ce travail était un screening des hydrolases extracellulaires chez des bactéries halotolérantes isolées d'anchois salés et séchés.

L'intérêt porté à ces microorganismes a abouti à la découverte d'une diversité inouïe, complètement inattendue, dans des milieux supposés hostiles à la vie. Egalement, les propriétés singulières de leurs biomolécules à savoir les enzymes ont très vite attiré l'attention des biotechnologues.

Dans cette étude, un screening de plusieurs activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires a été effectué sur 18 souches de bactéries halotolérantes.

Un milieu de culture spécifique aux halophiles à deux concentrations salines 5% et 10% (p/v) a servi à l'isolement et à la caractérisation des isolats. Les souches pures sont caractérisées macroscopiquement et microscopiquement puis soumises à une recherche qualitative d'activités hydrolytiques.

Ce travail a permis l'isolement de 18 souches hétérotrophes et aérobies dont la majorité se présente sous forme coccobacillaire à Gram négatifs souvent isolés et immobiles. La plupart des souches forment sur milieux solides des colonies beiges, le reste est pigmenté. L'ensemble des isolats peuvent croître en absence qu'en présence de sel. Elles peuvent être classées en halotolérantes. La plupart des isolats tolèrent des concentrations salines finales allant jusqu'à 10% (p/v). Ce sont donc fortement halotolérantes. Une croissance optimale de l'ensemble des isolats est observée à un pH de 6 à 7 et une température de 20 à 37°C. Ce sont donc des neutrophiles et mésophiles, respectivement.

Toutes les souches possèdent une catalase et sont incapables de produire la tryptophanase et l'urease. Une seule souche possède une nitrate réductase, trois sont capables de croître sur le citrate comme seule source de carbone et d'énergie et cinq produisent la  $\beta$ -galactosidase. La plupart des souches produisent l'ADH et 6 souches sur 10 possèdent les trois types d'enzymes (ADH, LDC et ODC). Les fermentations d'acides mixtes et d'acétoïnes sont très faibles.

Les souches qui oxydent le lactose et/ou le saccharose, fermentent le glucose. Cependant il y a absence de production de  $H_2S$  et de gaz. La plupart sont capables de fermenter le mannitol.

Ces souches sont étudiées pour la présence de 4 types d'enzymes extracellulaires, importantes industriellement. Dans ce but 6 différents substrats sont utilisés : amidon, pectine, caséine, Tween 20, Tween 80 et huile d'olive pour la détermination des activités amylolytique, pectinolytique, protéolytique et lipolytique, respectivement. Toutes les souches isolées sont productrices d'enzymes hydrolytiques extracellulaires. L'activité protéolytique avec la caséine comme substrat de base est

prédominante. L'activité amylolytique est observée chez 10 souches tandis que 3 isolats uniquement sont capables de dégrader la pectine.

L'hydrolyse des Tweens 20 et 80 est observé chez 14 et 4 souches, respectivement, par contre une seule souche est capable d'hydrolyser l'huile d'olive.

Il faut noter que des activités hydrolytiques combinées sont observées également 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 étude plus approfondie en introduisant de la chimiotaxonomie couplée à l'approche moléculaire.



*Références*

---

*bibliographiques*

## Références bibliographiques

- Ababouch L., El Marrakchi A. (2009).** Elaboration des semi-conserves d'anchois: aspects économiques, techniques et hygiéniques. *Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) 525*: 1-84.
- Agwua O., Oluwagunke T. (2014).** Halotolerance of heterotrophic bacteria isolated from tropical coastal waters. *Int J Sci: Basic Appl res. (IJSBAR) 16* : 224-231.
- Aissaoui N. (2013).** Etude de molécules d'antibiotiques biosynthétisées par une bactérie extremophile issue d'une sebkha algérienne El Goléa. Mémoire de magister en microbiologie appliquée. Université de Tlemcen. 1-174.
- Amoozegar M.A., Fatemi Z.A., Karbalaie-Heidari H.R., Razavi M.R. (2007).** Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiol Res* 162: 369-377.
- Amoozegar M.A., Malekzadeh F., Malik K.A. (2003).** Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *Microbiol Methods* 52: 353-359.
- Amoozegar M.A., Schumann P., Hajighasemi M., Ashengroph M., Razavi M.R. (2008).** *Salinicoccus iranensis* sp. nov., a novel moderate halophile. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 178-183.
- Anton J. (2014).** Halotolerance. *Encycl Astro.* 727-727.
- Anupama A., Jayaraman G. (2011).** Detergent stable, halotolerant  $\alpha$ -amylase from *Bacillus aquimaris* VITP4 exhibits reversible unfolding. *Int J Appl Biol Pharm Technol.* 2 : 366-376.
- 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*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 2436-2446.
- Aygan A., Arikan B., Korkmaz H., Dinçer S., Çolak O. (2008).** Highly thermostable and alkaline  $\alpha$ -amylase from an halotolerant-alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. *Braz J Microbiol* 39:547-553.
- Bacha M., Amara R., (2012).** Inter-cohort differences in growth, condition and feeding of juvenile anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Gulf of Béjaia (Algerian coast, SW Mediterranean): Implications for recruitment success. *FISH RES.* 129-130.
- Bakhtiar S., Estiveira R.J., Hatti-Kaul R. (2005).** Substrate specificity of alkaline protease from alkaliphilic feather-degrading *Nesterenkonia* sp. AL20. *Enzyme Microb Technol* 37: 534-540.
- Berkel B.M., Boogaard B.V., Heijnen C. (2005).** La conservation du poisson et de la viande. 2<sup>ème</sup> édition. *Fond Agrom, Wageningen.* 1-90.

## Références bibliographiques

- Biswas J., Paul A.k., (2014).** Production of Extracellular Polymeric Substances by Halophilic Bacteria of Solar Salterns. *Chin J Biol* 2014 : 1- 12.
- Blanco P., Sieiro C., Reboredo N.M., Villa T.G. (1998).** Cloning, molecular characterization, and expression of an endo-polygalacturonase-encoding gene from *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b. *FEMS Microbiol Lett* 164 (2):249-55.
- Chakraborty S., Khopade A., Kokare C., Mahadik K., Chopade B. (2009).** Isolation and characterization of novel  $\alpha$ -amylase from marine *Streptomyces* sp. D1. *J Mol Cat B: Enz* 58(1): 17-23.
- 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. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 2403–2408.
- Cosnard M., Vallet J., Kabbaj F. (1983).** Données sur le phénomène de la maturation de l'anchois. *Science et pêche, bull. Inst. Pêches marit.* 3-11.
- Dalmaso G.Z.L., Ferreira D., Vermelho A.B. (2015).** Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *J Mar Dru* 13:1925-1965.
- Dassarma P., Coker J.A., Huse V., Dassarma S. (2010).** Halophiles, industrial applications. *Encyclo Ind Biotechnol: 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: Horikoshi K. (ed.), *Extremophiles Handbook, Springer.* 1248.
- Delgado-García M., Aguilar C.N., Contreras-Esquivel J.C., Rodríguez-Herrera. R. (2014).** Screening for extracellular hydrolytic enzymes production by different halophilic bacteria. *Mycopath* 12 (1): 17-23
- Dewi E.N., (2001).** Chemical analysis during the processing of dried salted anchovy, *J Coast Develop* 5 : 55-65.
- Diop M.Y. (2007).** Séminaire de formation en groupe sur les techniques améliorées de traitement de conservation et de transformation du poisson et des produits halieutiques : 10.
- Durand P. (1982).** Etude de la fraction azotée soluble de l'anchois salé en cours de maturation. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.* 45: 271-281.
- Eed J. (2013).** Factors Affecting Enzyme Activity. *ESSAI acad J* 10: 48-51.

## Références bibliographiques

- Esteban-Torres M., Mancheno J. M., De las Rivas B., Muñoz R. (2014).** Characterization of a cold-active esterase from *Lactobacillus plantarum* suitable for food fermentations. *J Agric Food Chem* 62: 5126–5132.
- 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.
- Gainvors A., Nedjaoum N., Gognies S., Muzart M., Nedjma M., Belarbi A. (2000).** Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL1-1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett* 183:131–135.
- Geetha M., Saranraj P., Mahalakshmi S., Reetha D. (2012).** Screening of pectinase producing bacteria and fungi for its pectinolytic activity using fruit wastes. *Int J Biochem Biotech Sci* 1: 30-42.
- Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W. A., Krieg N. R. (1994).** Methods for General and Molecular Bacteriology. Washington, DC. *ASM*. 791.
- Ghanem A. (2007).** Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* 63 (8): 1721-1754.
- Gonzalez C., Gutierrez C., Ramirez C. (1978).** *Halobacterium vallismortis* sp. nov. an amylolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol* 24: 710–715.
- Gram C. (1884).** The Differential Staining of Schizomycetes in Tissue Sections and in Dried Preparations. *Fortschritte der Medicin* 2:185-189.
- Grant WS, BW Bowen. (1998).** Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Hered.* 89: 415-426
- Grant W.D., Kamekura M., McGenity T.J., Ventosa A. (2001).** Class III. *Halobacteria* class nov. In: Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1, 2<sup>nd</sup> edn, The *Archaea* and the deeply branching and phototrophic *Bacteria*. Springer, New York. Pp. 294–301.
- Guiraud J. (1998).** *Microbiologie alimentaire*. Edition Donod, Paris. Pp. 8-101.
- Gupta R., Gigras P., Mohapatran H., Goswami K.V., Chauhan B. (2003).** Microbial  $\alpha$ -amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 38: 1599-1616.
- Harley J.P., Prescott L.M. (2002).** *Laboratory Exercises in Microbiology*, Fifth Edn. P. 449.
- Hiraga K., Nishikata Y., Namwong S., Tanasupawat S., Takada K., Oda K. (2005).** Purification and characterization of serine proteinase from a halophilic bacterium, *Filobacillus* sp. RF2-5. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 38-44.
- Jayani R.S., Saxena S., Gupta R. (2005).** Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Proc Biochem* 40 : 2931–2944.

## Références bibliographiques

- Jiang X., Huo Y., Cheng H., Zhang X., Zhu X., Wu M. (2012). Cloning, expression and characterization of a halotolerant esterase from a marine bacterium *Pelagibacterium halotolerans* B2T. *Extremophiles* 16 (3): 427-435.
- Joffin J.N., Leyral G. (2006). Microbiologie technique, tome 1: dictionnaire des techniques 4<sup>ème</sup> Edn. P. 361.
- Joshi A.A., Kanekar P.P., Kelkar A.S., Shouche Y.S., Vani A.A., Borgave S.B., Sarnaik S.S. (2008). Cultivable bacteria diversity of alkaline Lonar lake India. *Microbial Ecology* 55:163–172.
- Kada O., Abdellaoui S., Ramdani M., Nachit D. (2009). Contribution à l'identification et à la caractérisation biologique et dynamique de l'anchois de la lagune de Nador (Maroc). *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie* 31 : 91-98.
- Kamekura M., Onishi H. (1974). Halophilic nuclease from a moderately halophilic *Micrococcus varians*. *J. Bacteriol* 119: 339-344.
- Karan R., Capes M.D., DasSarma S. (2012). Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Aquat. Biosyst* 8: 1-15.
- Karbalaei-Heidari H.R., Amoozegar M.A., Ziaee A.A. (2009). Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium. *Ind Microbiol Biotechnol* 36: 21-27.
- Kumar S., Khare S.K. (2012). Purification and characterization of maltooligosaccharide-forming  $\alpha$ -amylase from moderately halophilic *Marinobacter* sp. EMB8. *Biores Technol* 116: 247–251.
- Kunte H.J., Trüper H.G., Stan-Lotter H. (2002). Halophilic microorganisms. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 185-200.
- Kushner D.J. (1978). Life in high salt and solute concentrations. In: Kushner D.J (ed) *Microbial Life in Extreme Environments*. Academic Press London. Pp. 317-368.
- Kushner D.J., (1993). Growth and nutrition of halophilic bacteria, In: Vreeland R.H., Hochstein L.I. (ed) *The Biology of Halophilic Bacteria*. Boca Raton, CRC Press.
- Kwon Y.T., Kim J.O., Moon S. Y., Yoo Y. D., Rho H. M. (1995). Cloning and characterization of the gene encoding an extracellular alkaline serine protease from *Vibrio metschnikovii* strain RH530. *Gene* 152 (1) : 59-63.
- Léopold M. (2014). Poisson de mer de Guyane. *Edition Ifremer*. 216.
- Li X., Yu H.Y. (2011). Extracellular production of beta-amylase by a halophilic isolate, *Halobacillus* sp. LY9. *J Indust Microbiol Biotechnol* 38 (11): 1837-1843.
- Li X., Yu H.Y. (2012). Purification and characterization of novel organic-solvent-tolerant  $\alpha$ -amylase and serine protease from a newly isolated *Salimicrobium halophilum* strain LY20. *FEMS Microbiol Lett* 329 (2): 204-211.

## Références bibliographiques

- Mageswari A., Subramanian P., Chandrasekaran S., Sivashanmugam K., Babu S., Gothandam K.M. (2012).** Optimization and immobilization of amylase obtained from halotolerant bacteria isolated from solar salterns. *J Gen Engin Biotechnol* 10:201–208.
- Margesin R., Schinner F. (2001).** Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5:73–83.
- Martin P., Bahamon N., Sabatés A., Maynou F., Saénchez P., Demestre M. (2008).** European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) landings and environmental conditions on the Catalan Coast (NW Mediterranean) during 2000–2005. *Hydrobiologia* 612:185–199.
- Mégraud F. (2011).** De l'agent infectieux à l'hôte-bactériologie : Physiologie bactérienne, pouvoir pathogène des bactéries. Cours PCEM 2: 1-6.
- Mevarech M., Frolow F., Gloss L.M. (2000).** Halophilic enzymes: Proteins with a grain of salt. *Biophys. Chem.* 86: 155-164.
- Mezedjri L., Kerfouf A., Tahar A. (2013).** Reproductive cycle of the European anchovy *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) (Clupeiformes *Engraulidae*) in the gulf of Skikda (Algerian East coasts). *J Biodiv* 4: 269-274.
- Mijts B.N., Patel B.K.C. (2002).** Cloning, sequencing and expression of an  $\alpha$ -amylase gene, amyA, from the thermophilic halophile *Halothermothrix orenii* and purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiol* 148: 2343-2349.
- Moreno M.L., Mellado E., Garcia M.T., Ventosa A. (2007).** Diversity of extreme halophiles producing hydrolytic enzymes in hypersaline habitats. *Halophiles-2007 booklet.* 59–60.
- Moreno M.D.L., Garcia M.T., Ventosa A., Mellado E. (2009).** Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase- and proteaseproducing extreme halophile. *FEMS Microbiol Ecol* 68: 59-71.
- Motos L. (1996).** Reproductive biology and fecundity of the Bay of Biscay anchovy population (*Engraulis encrasicolus* L.). *Sci. Mar* 60: 195-207.
- Nwagu T.N., Okolo B.N. (2011).** Extracellular amylase production of a thermotolerant *fusarium* sp. Isolated from Eastern Nigerian soil. *Braz Archiv Biol Technol* 54: 649-658.
- Oliveira L.C.G., Ramos P.L., Marem A., Kondo M.Y., Rocha R.C.S., Bertolini T., Silveira M.A.V., Cruz J.B., Vasconcellos S.P., Juliano L., Okamoto D.N. (2014).** Halotolerant bacteria in the São Paulo Zoo composting process and their hydrolases and bioproducts. *Braz J Microbiol* 46 (2) : 347-354.

## *Références bibliographiques*

- Oren A., Ventosa A., Grant W. D. (1997).** Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order Halobacteriales. *Int J Syst Bacteriol* 47: 233-238.
- Oren A. (2002).** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28: 56-63.
- Oren A. (2006).** Life at High salt concentrations Prokaryotes. *Prokaryotes* 2:263–282.
- Oren A. (2008).** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Prokar Com Ecophysiol* 4 :421-440.
- Peng Q-Z., Peng Q-J., Zhang Y-Q., Liu Z-X., Wang Y-X., Li W-J., Cui X-L., Chen Y-G. (2009).** *Halobacillus hunanensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a subterranean brine. *Antonie van Leeuwenhoek* 96:497–504.
- Prakash B., Vidyasagar M., Madhukumar M.S., Muralikrishna G., Sreeramulu K. (2009).** Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable  $\alpha$ -amylase from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochem* 44: 210-215.
- Rohban R., Amoozegar M.A., Ventosa A. (2009).** Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Ind Microbiol Biotechnol* 36: 333-340.
- Rokade D.D., Vaidya S.L., Rehman Naziya M.A., Dixit. P.P. (2015).** Screening of Pectinase Producing Bacteria, isolated From Osmanabad Fruit Market Soil. *Int J Interdiscipl Multidiscipl Stud (IJIMS)* 2 (6) :141-145.
- 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.
- Sánchez-Porro C., Martin S., Mellado E., Ventosa A. (2003).** Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Appl Microbiol* 94: 295-300.
- Saxena K.R., Dutt K., Agarwal L., Nayyar P. (2007).** A highly and thermostable alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technol* 98:260–265.
- Setati M.E. (2010).** Diversity and industrial potential of hydrolase-producing halophilic/halotolerant eubacteria. *Afr J Biotechnol* 9: 1555-1560.
- Setyorini E., Takenaka S., Murakami S, Aoki K. (2006).** Purification and characterization of two novel halotolerant extracellular protease from *Bacillus subtilis* strain FP-133. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 433-440.

## *Références bibliographiques*

- Shivanand P., Jayaraman G. (2009).** Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochem* 44 (10): 1088-1094.
- Sigurgísladóttir S., Konraosdottir M., Jonsson A., Kristjansson J.K., Matthiasson E. (1993).** Lipase activity of thermophilic bacteria from icelandic hot springs. Volume15, Number 4: 361-366.
- Sinsuwan S., Rodtong S., Yongsawatdigul J. (2008).** Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. *Process Biochem* 43: 185–192.
- Sinsuwan S., Rodtong S., Yongsawatdigul J. (2009).** Purification and characterization of a salt-activated and organic solvent- stable heterotrimer proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from Thai fish sauce. *J agri food chem* 58(1): 248-256.
- Soares-Marcia M., De Silva R., Gómez E. (1999).** Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiol* 30: 299-303.
- Solomon F.E., Viswalingam K.(2013).** Isolation, Characterization of Halotolerant bacteria and its biotechnological potentials. *Inter J Sci Engin Rese* 4 :1-7.
- Su J.H., Chang M.C., Lee Y.S., Tseng I.C., Chuang Y.C. (2004).** Cloning and characterization of the lipase and lipase activator protein from *Vibrio vulnificus* CKM-1. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1678 (1) : 7-13.
- Subov N. N. (1931).** Oceanographical Tables. Moscow: USSR Oceanographic Institute Hydrometeorological Commission.
- Sundarram A., Murthy T.P.K. (2014).**  $\alpha$ -Amylase Production and Applications: A Review. *J Appl Env Microbiol* 2 : 166-175.
- Tahrioui A., Schwab M., Quesada E., Llamas I. (2013).** Quorum sensing in some representative species of *Halomonadaceae*. *Life*. 3: 260-275.
- Taprig T., Akaracharanya A., Sitdhipol J., Visessanguan W., Tanasupawat S. (2013).** Screening and characterization of protease-producing *Virgibacillus*, *Halobacillus* and *Oceanobacillus* strains from Thai fermented fish. *J Appl Pharm Sci* 3 (02), 25-30
- Torreblanca, M., Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M., Kates, M. (1986).** Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. And *Haloferax* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* 8 : 89–99.
- Trüper H.G., Severin J., Wohlfarth A., Muller E., Galinski E.A. (1991).** Halophily - taxonomy – phylogeny and nomenclature 201 : 3-7.



*Annexe*

---

---

## *Annexe*

### **Composition des milieux et réactifs (Harley et Prescott, 2002)**

#### **Réactifs de la coloration de Gram :**

- Solution d'acide acétique à 2%: 2mL d'acide acétique ajoutés à 100mL d'eau distillée;
- Solution de violet de gentiane : 1g de violet de gentiane ; 10 mL d'alcool éthylique à 95% ; 2g de phénol ajoutés à 100mL d'eau distillée ;
- Solution de lugol de Gram: 1g d'iodure de potassium; 1g d'iode ajoutés à 300 mL d'eau distillée ;
- Solution de fuschine de ziehl (Guiraud et Galzy, 1980). 1 g de Fuschine; 10mL d'alcool éthylique à 95%; 5g de phénol ajoutés à 100ml d'eau distillée.

#### **Préparation des solutions salines**

Les solutions salines: 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5% et 15% sont les dilutions de la solution mère à 30% de salinité.

Par exemple:

À 5% : on utilise 41,7 mL de stock de sel préalablement préparé et on complète le volume avec 208,3 mL d'eau distillée pour obtenir 250 mL de la solution saline.

À 7,5% : on utilise 62,5 mL de stock de sel préalablement préparé et on complète le volume avec 187,5 mL d'eau distillée.

À 15% : on utilise 125 mL de stock de sel préalablement préparé et on complète le volume avec 125mL d'eau distillée.



Présenté par: **Chefirat Sonia**

Année universitaire: **2015-2016**

**Titous Soumia**

**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 l'isolement et la purification de bactéries halotolérantes d'anchois salés et séchés, un poisson très consommé conservé par le sel et séché à l'air libre, puis de mettre en évidence la présence d'enzymes hydrolytiques extracellulaires comme les amylases, les pectinases, les protéases et les lipases. La majorité des isolats sont beiges, à surface lisse, plates, circulaires, à bords réguliers et dont le diamètre varie de 1 à 2 mm. La coloration de Gram a révélé une dominance des Coccobacilles à Gram négatifs, souvent isolés. Toutes les souches sont catalase positives. Le test de la croissance des isolats sur une gamme de concentrations salines allant de 0% à 15% (p/v) de sels, a montré que l'ensemble des souches sont fortement halotolérantes. Tous les isolats sont producteurs d'enzymes hydrolytiques avec une prédominance de l'activité protéolytique.

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

### **Abstract**

The objective of this work is the isolation and the purification of halotolerant bacteria of dried salted anchovies, a very consummate fish preserved by the salt and dried by free air, then to highlight the presence of extracellular hydrolytic enzymes as amylases, pectinases, proteases and lipases. The majority of isolates are beige, on smooth surface, flat, circular, in regular edges and the diameter of each varies from 1 to 2 mm. A dominance of short rods with rounded ends, Gram negative, isolated was recorded. All strains are catalase positive. The test of the growth of isolates on a range of salt concentration going from 0% to 15% (w/v) of salts, showed that all the strains are strongly halotolerants. All the isolates produce hydrolytic enzymes with predominance of the proteolytic activity.

**Key word :** Dry salted anchovies, halotolerant bacteria, extracellular hydrolytic enzymes.

### **المخلص :**

الهدف من هذا العمل هو عزل و تنقية الكائنات الدقيقة من الأنشوفة المالحة و المجففة الذي يعتبر شديد الاستهلاك محفوظ بواسطة الملح، ثم البحث عن إنزيمات الإماهة المفترزة خارج الخلية مثل: الأميلاز، البكتيناز، البروتياز و الليباز. أغلبية السلالات البكتيرية المعزولة بيجية اللون، ملساء، مستوية و كروية الشكل، ذات حواف عادية، قطرها يتراوح بين 1 و 2 مم. مع الكشف عن هيمنة الشكل العصوي ذو نهيات دائرية غالبا ما تكون وحيدة و ذات غرام سلبي. كل السلالات إيجابية الكاتالاز. أظهر اختبار نمو السلالات على نطاق تركيز ملحي من 0% إلى 15% أنها تستطيع النمو في غياب أو حضور الملح على نطاق واسع كل السلالات المعزولة منتجة لإنزيمات الإماهة مع هيمنة نشاط إنزيم البروتياز.

**الكلمات المفتاح :** الأنشوفة المالحة و المجففة، البكتيريا المتحللة للملح، إنزيمات الإماهة مفترزة خارج الخلية.

