

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

جامعة امحمد بوقرة – بومرداس

Université M'hamed Bougara de Boumerdès



Faculté Des Sciences

Département de Biologie

Mémoire de projet de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme de

MASTER II

Domaine : science de la Nature et de la Vie

Filière Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie Microbienne.

**THÈME :**

**Les Bactéries halophiles qui tolèrent les métaux lourds : Mercure.**

Réalisé par :

M<sup>elle</sup> BELKADI Imene.

M<sup>elle</sup> BENNAMANE Nesrine.

M<sup>elle</sup> SEBAI Amira.

Le jury :

Mme *KHEMILI- TALBI S.*

Pr (UMBB)

Présidente

Mme *BENZINA F*

MCA (UMBB)

Examinatrice

Mme *AKMOUSSI- TOUMI S.*

MCB (UMBB)

Promotrice

Mme *SAYAH A.*

MAA (UMBB)

Co-promotrice

2020/2021



## Remerciements



*Al hamdoulillah,*

*On dit souvent que le trajet est aussi important que la destination. Ces cinq années nous ont de bien comprendre la signification de cette phrase toute simple. Ce parcours en effet, ne nous s'est pas réalisé sans défis et sans soulever de nombreuses questions pour lesquelles les réponses nécessitent de longues heures de travail.*

*En tout premier lieu, on doit remercier **Allah** le tout puissant de nous avoir données les ressources morales, physiques, matériels et intellectuelles pour terminer ce travail.*

*Nos sentiments de gratitude vont en premier lieu à **Mme AKMOUSSI Sihem**, notre promotrice de projet de fin d'étude à UMBB, qui nous a soutenus et nous a aidée pour la réalisation de ce projet.*

*On tient à remercier également notre co-promotrice **Mme SAYAH Amna**, qui nous a suivi tout au long de cette période et nous a conseillée sur l'orientation de celui-ci devait prendre.*

*On présente nos profonds respects et nos reconnaissances à **Mr GANA Mohamed Lamine**, le chef de département « corrosion bactérienne » au niveau de la **CRD** (Centre de Recherche et de Développement) à Boumerdes pour nous avoir offert l'opportunité d'effectuer ce stage, ainsi que **Mlle DIB Ouadiaa**, **Mme BENYOUCHEF Sonia**, **Mme HELLAJ Tindhinene** et **Mme Imene** la technicienne de laboratoire au niveau de l'UMB B qui nous ont aidées et encouragées durant la période de stage.*

*Nous remercions également les membres de jury qui nous feront l'honneur de lire et d'évaluer notre travail.*

*Enfin, nous remercions tous les enseignants qui ont contribué à notre formation universitaire.*



*Je tiens c'est avec un grand plaisir que je dédie ce modeste travail :*

*A mes chers parents, « **Mustapha** » et « **Zerifi Fatma** », aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Et que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices.*

*Puisse Dieu le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.*

*A ma chère petite Sœur « **Lyna** », et mes chers frères « **Amine** », « **Housseem** », « **Adel** », « **Mohamed** » et leurs femmes qui n'ont pas cessées de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.*

*A mes chers nièces et neveux*

*A ma plus chère amie et binôme « **Nesrine** » qui m'a accompagnée durant toute ma carrière scolaire et universitaire et toute sa famille.*

*A ma chère amie et trinôme « **Amira** » qui m'a accompagnée durant ma carrière universitaire et sa famille.*

*A ma chère grand-mère et mes chères tantes que dieu leur donne une longue et joyeuse vie.*

*A mes chères cousin(e)s, exceptionnellement : **Lyly, Fifi, Nihed, Brahim, Aymen, Nabil et Billel.***

*Merci pour leurs amours et leurs encouragements.*

*A la mémoire de mes grands-pères et ma grand-mère, que Dieu ait votre âme dans sa sainte miséricorde.*

*A mes chères copines, exceptionnellement : **Rania, Abir, Nadjet, Hadjer, Amira, Imene, Selma, Maha, Celia et Asma.***

*A tous les membres de ma famille et toute personne qui porte le nom « **BELKADI** » et « **ZERIFI** ». Je dédie ce travail à tous ceux qui ont participé à ma réussite de près ou de loin.*

*Enfinement à tous mes collègues de la promotion BTM 2021.*

*Imene.*





*Du profond de mon cœur je dédié ce modeste travail à tous ce qui me sont chers,*

*A la mémoire de ma chère maman « HADDOU Djamilia »*

*Ce travail est dédié à l'amour de ma vie ma mère, qui nous a quittés trop tôt, mais qui reste toujours vivante dans mon cœur.*

*J'espère que, du monde qui sien maintenant, il apprécié cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prier pour le salut de son âme.*

*Puisse Dieu, le tout puissant l'avoir en sa sainte miséricorde.*

*J'aurais tant aimé que tu sois présente à mes côtés et fière de moi.*

*A mon cher papa « Youcef », puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

*A mon cher frère « Zakou » et mes chères sœurs « Imane », « Manel » et « Bouchra ».*

*A la mémoire de ma chère grand-mère, que Dieu ait ton âme dans sa sainte miséricorde.*

*A ma chère grand-mère très malade, je vous souhaite une longue vie.*

*A ma chère amie, sœur et binôme « Imene » qui m'a accompagnée durant toute ma carrière scolaire et universitaire et sa famille.*

*A ma chère amie et trinôme « Amira » qui m'a accompagnée durant ma carrière universitaire et sa famille.*

*A mes chères tantes et mes chères cousin(e)s, exceptionnellement : « Abir ».*

*A mes chères copines exceptionnellement : Selma, Hadjer, Imene, Amira, Rania, Abir, Maha, Celia et Asma.*

*Je dédié ce travail a tous ceux qui m'ont aidé et tous ceux qui me connaissent de près ou de loin.*

*Finalement à tous mes collègues de la promotion BTM 2021.*

**Nesrine.**





## *Dédicaces*

*C'est un moment de plaisir de dédier ce travail :*

*A ma mère « **Madas Bahia** » qui m'a soutenu et encouragé sans elle je n'aurais certainement pas fait d'études longues et à mon père « **Mourad** » qui m'a appris le sens de travail et de la responsabilité. Aucun langage ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous.*

*A la mémoire de ma chère grand-mère « **Fatima el zahra** », que Dieu ait ton âme dans sa sainte miséricorde.*

*A toi mon grand-père « **Mokhtar** », ceci est ma gratitude pour ton éternel amour, que ce travail soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir.*

*A mes chères sœurs : « **Khadija** », « **Fatima el zahra** » et « **Zaineb** » et mon adorable petit frère « **Ayoub** ».*

*Particulièrement à « **Khalié Mouhamed** » et « **Khalié Djamel** » j'exprime envers vous une profonde admiration et reconnaissance.*

*A mes chères tantes, oncles et mes chères cousin(e)s, exceptionnellement « **Ghada** ». Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.*

*A mes chère amies et partenaires « **Imene** » et « **Nesrine** » qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail.*

*Enfinement à tous mes collègues de la promotion BTM 2021.*

*Amira*



## *Liste des abréviations*

**ADN** : acide désoxyribonucléique.

**ARN<sub>r</sub>** : acide ribonucléique ribosomique.

**ATP**: adénosine triphosphate.

**As**: arsenic.

**Ag** : argent.

**Au** : or.

**A<sub>w</sub>** : activité d'eau.

**Br<sup>-</sup>** : brom.

**Bi<sup>2+</sup>**: ion bismuth.

**°C** : degree Celsius.

**Ca<sup>2+</sup>** : calcium.

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

**Cal. mol<sup>-1</sup>** : calories par mole.

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

**Cd**: cadmium.

**Cl<sup>-</sup>** : ion chlorure.

**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone.

**Co** : Cobalt.

**Cr** : chrome.

**CRD** : Centre de Recherche et de Développement.

**Cu** : cuivre.

**ETMs** : Les éléments de trace métalliques.

**Fe** : fer.

**FeS<sub>2</sub>** : disulfure de fer.

**g.L<sup>-1</sup>** : grammes par litre.

**g/cm<sup>3</sup>** : gramme par centimètre cube.

**H<sub>m</sub> MalDH** : malate déshydrogénase.

**Hg** : mercure.

**K<sup>+</sup>** : ion potassium.

**KCl** : chlorure de potassium.

**Li<sup>+</sup>** : ion lithium.

**Mg<sup>+</sup>** : magnésium.

**MPa** : megapascal.

**Mo** : Molybdène.

**Na<sup>+</sup>** : ion sodium.

**NaCl** : chlorure de sodium.

**Ni** : nickel.

**Ni-Cd** : accumulateur Nickel-Cadmium.

**Pt<sup>+</sup>** : platinum.

**Pb** : Le plomb.

**pH** : potentiel hydrogène.

**ppm** : partie par million.

**Pu** : plutonium.

**Sn<sup>2+</sup>** : ion étain.

**Sb**: Antimoine.

**Ti** : Titane.

**SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>** : ion sulfate.

**Se** : sélénium.

**U** : Uranium.

**Zn** : le zinc.

**ZnO Nps** : nanoparticules oxyde de Zinc.

**Rpm** : rond par minute.

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : environnement hypersalins thalassohalins.....	4
<b>Figure 2</b> : Environnements hyper salins athalassohalins.....	5
<b>Figure 3</b> : pseudo-sables très salés et sodiques de la lunette d'elmabtouh.....	6
<b>Figure 4</b> : sols salés et sodiques des sebkhas en tunisie.....	6
<b>Figure 5</b> : La distribution de microorganismes halophiles dans l'arbre du vivant.....	9
<b>Figure 6</b> : Solution milieu SH liquide standard.....	34
<b>Figure 7</b> : Aspect microscopique des souches halophiles (S1, S2, S3, S4, S5, S6 et S7) à l'état frais G X40.....	46
<b>Figure 8</b> : Aspect microscopique des souches halophiles S1, S2, S3, S4, S5, S6 et 7 après coloration de Gram G X40.....	47
<b>Figure 9</b> : Les pré-cultures des souches de S1 à S7 après 16 jours d'incubation dans un incubateur agitateur 40°C 150rpm.....	49
<b>Figure 10</b> : Cinétique de croissance de la souche S3 sur milieu SH liquide à 15% de NaCl en présence des différentes concentrations de HgCl <sub>2</sub> à 40°C et à 150 rpm pendant 10 jours d'incubation.....	50
<b>Figure 11</b> : Cinétique de croissance de la souche S5 sur milieu SH liquide à 15% de NaCl en présence des différentes concentrations de HgCl <sub>2</sub> à 40°C et à 150 rpm pendant 10 jours d'incubation.....	51
<b>Figure 12</b> : Cinétique de croissance de la souche S7 sur milieu SH liquide à 15% de NaCl en présence des différentes concentrations de HgCl <sub>2</sub> à 40°C et à 150 rpm pendant 10 jours d'incubation.....	52
<b>Figure 13</b> : Aspect des cultures des souches S3, S5 et S7 à différentes concentrations de HgCl <sub>2</sub> après 10 jours d'incubation.....	54

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Composition ionique d'environnements thalassohalins et athalassohalins.....	6
<b>Tableau II</b> : Conditions extrêmes les plus fréquemment retrouvées et exemple d'organismes colonisateurs.....	8
<b>Tableau III</b> : classification des pollutions anthropiques.....	19
<b>Tableau IV</b> : Sources industrielles et agricoles des métaux présents dans l'environnement..	20
<b>Tableau V</b> : Propriétés physicochimiques du plomb. ....	21
<b>Tableau VI</b> : Propriétés physicochimiques du Mercure.....	22
<b>Tableau VII</b> : Propriétés physicochimiques du Cadmium.....	22
<b>Tableau VIII</b> : Propriétés physicochimiques du Zinc.....	23
<b>Tableau IX</b> : Propriétés physicochimiques du Cuivre. ....	24
<b>Tableau X</b> : Propriétés physicochimiques du Nickel. ....	24
<b>Tableau XI</b> : classification périodique des éléments. ....	25
<b>Tableau XII</b> : Temps de demi-vie biologique de quelques éléments .....	26
<b>Tableau XIII</b> : Les mesures effectuées pour la préparation de la solution mère.....	38
<b>Tableau XIV</b> : concentration de métal testé dans les pré-cultures de la souche S1 à la souche S7.....	38
<b>Tableau XV</b> : les différentes mesures pour la préparation des cultures des souches S3, S5 et S7 en présence du métal testé (HgCl <sub>2</sub> ). ....	39
<b>Tableau XVI</b> : Résultats des paramètres organoleptiques. ....	41
<b>Tableau XVII</b> : Résultats des analyses physiques. ....	41
<b>Tableau XVIII</b> : Résultats des analyses chimiques. ....	43
<b>Tableau XIX</b> : Caractères macroscopiques des colonies des 7 souches halophiles après 15jours d'incubation à 40°C sur milieu SH solide.....	45
<b>Tableau XX</b> : Les résultats de l'observation au microscope optique à l'état frais et la coloration de Gram des 7 souches halophiles. ....	48

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

<b>Introduction</b> .....	1
<b>1 Les environnements hypersalins</b> .....	3
1.1 Concentration en sels et composition ionique.....	3
1.2 Environnements thalassohalins.....	3
1.2.1 Environnement thalassohalin d'origine anthropique : les marais salants .....	3
1.2.2 Environnement thalassohalin d'origine naturelle : les sebkhas, lacs intérieurs et lagons.....	4
1.3 Environnements athalassohalins.....	4
1.4 Les Sols salés.....	6
<b>2 Les microorganismes extrêmophiles</b> .....	7
2.1 Le monde des extrêmophiles .....	7
2.1.1 Les microorganismes halotolérants et halophiles.....	7
2.2 Diversité phylogénétique des halophiles .....	9
2.2.1 Archaea halophiles .....	9
2.2.2 Eucaryotes halophiles.....	10
2.2.3 Bactéries halophiles.....	11
2.2.3.1 Phylum Proteobacteria.....	11
2.2.3.2 Phylum Firmicutes.....	11
2.2.3.3 Phylum Actinobacteria .....	12
2.2.3.4 Phylum Spirochètes .....	12
2.2.3.5 Phylum Bacteroidetes .....	12
2.3 Adaptation des microorganismes halophiles et halotolérants à la salinité .....	12
2.3.1 Adaptation par accumulation de KCl.....	13
2.3.2 Adaptation par production et accumulation d'osmoprotecteurs.....	13
2.4 Diversité métabolique des halophiles .....	14
<b>3 Les métaux lourds</b> .....	15
3.1 Définition des métaux lourds.....	16
3.2 Classification des métaux lourds .....	17
3.3 Origine des métaux lourds .....	17

3.3.1	Origines naturelles.....	17
3.3.2	Origines anthropiques .....	18
3.4	Exemples des métaux lourds .....	20
3.4.1	Plomb .....	20
3.4.2	Mercure .....	21
3.4.3	Cadmium .....	22
3.4.4	Le Zinc .....	22
3.4.5	Le Cuivre.....	23
3.4.6	Le Nickel .....	24
3.5	Paramètres influençant la biodisponibilité des métaux lourds .....	25
3.6	Effet des métaux lourds .....	26
3.6.1	Sur le vivant .....	26
3.6.2	Sur les microorganismes .....	27
<b>4</b>	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>28</b>
4.1	Matériels .....	28
4.1.1	Matériels non biologiques .....	28
4.1.2	Matériels biologiques .....	28
4.1.3	Milieus de culture .....	28
4.2	Méthodes .....	28
4.2.1	Sites d'étude et échantillonnage.....	28
4.2.2	Prélèvement des échantillons .....	29
4.2.3	Analyse physicochimique des échantillons de l'eau .....	29
4.2.3.1	Les paramètres organoleptiques .....	29
4.2.3.2	Paramètres physiques .....	30
4.2.3.2.1	Mesure de la Température (méthode d'électrochimique).....	30
4.2.3.2.2	Mesure du pH.....	30
4.2.3.2.3	Mesure de la turbidité (méthode Néphélométrique) .....	30
4.2.3.2.4	Mesure de la conductivité .....	30
4.2.3.3	Paramètres chimiques .....	31
4.2.3.3.1	Dosage du Calcium par complexométrie .....	31
4.2.3.3.2	Dosage du Magnésium par complexométrie.....	31
4.2.3.3.3	Dosage des Chlorures par volumétrie .....	32
4.2.3.3.4	Dosage des Carbonates et des bicarbonates par acidimétrie.....	32
4.2.3.3.5	Dosage des Sulfates.....	33

4.2.3.3.6	Mesure de la salinité.....	33
4.2.4	Analyse bactériologique des eaux .....	33
4.2.5	L'étude de l'effet du mercure sur la croissance des souches halophiles .....	34
4.2.5.1	Matériel.....	34
4.2.5.1.1	Les souches bactériennes .....	34
4.2.5.1.2	Milieux de cultures.....	34
4.2.5.2	Méthodes .....	34
4.2.5.2.1	Préparation du milieu SH standard .....	34
4.2.5.2.2	Revivification des souches .....	35
4.2.5.2.3	Vérification de la pureté des souches halophiles .....	35
4.2.5.2.3.1	Etude macroscopique.....	35
4.2.5.2.3.2	Examen microscopique.....	36
4.2.5.2.4	Etude de l'effet du mercure (HgCl <sub>2</sub> ) sur la croissance des souches halophiles.....	37
4.2.5.2.4.1	Préparation de la solution mère .....	37
4.2.5.2.4.2	Préparation des pré-cultures .....	38
4.2.5.2.4.3	Préparation des cultures en présence du mercure .....	38
4.2.5.2.4.4	Suivie de la croissance cellulaire des souches (S3, S5 et S7) en présence du mercure .....	39
4.2.5.2.4.5	Centrifugation et récupération du surnageant.....	40
4.2.5.2.4.6	Dosage du Mercure restant dans les surnagent des différentes cultures par la technique ICP-MS.....	40
<b>5</b>	<b>Résultats et discussion .....</b>	<b>41</b>
5.1	Analyses physico-chimiques .....	41
5.1.1	Paramètres organoleptiques.....	41
5.1.2	Paramètres physiques .....	41
5.1.2.1	pH .....	42
5.1.2.2	Température.....	42
5.1.2.3	La conductivité .....	42
5.1.2.4	La turbidité .....	42
5.1.3	Paramètres chimiques.....	42
5.1.3.1	Sels minéraux dissous.....	42
5.1.3.2	Salinité.....	44
5.2	Revivification des souches bactériennes .....	44
5.3	Vérification de la pureté des souches halophiles.....	44

5.3.1	Etude macroscopique .....	44
5.3.2	Etude microscopique .....	46
5.3.2.1	Examen à l'état frais .....	46
5.3.2.2	Examen après coloration de Gram.....	47
5.4	Effets du mercure sur la croissance des souches halophiles.....	48
5.4.1	Réalisation des pré-cultures en présence de 1ppm HgCl <sub>2</sub> .....	48
5.4.2	Suivi de la fermentation en batch des souches S3, S5 et S7 en présence du mercure (HgCl <sub>2</sub> ).....	49
5.4.3	Observation de l'effet du mercure sur la production des pigments caroténoïdes.....	53
5.4.4	Bioaccumulation du mercure par les cellules bactériennes halophiles étudiées.....	54
<b>Conclusion et perspectives.....</b>		<b>56</b>

**Références bibliographiques**

**Annexes**



# ***Introduction***

Les formes de vie sur Terre sont innombrables, comme les environnements qui les abritent. Jusqu'au 20<sup>ème</sup> siècle, on pensait que la vie n'était possible que dans un environnement « normal », c'est-à-dire là où les conditions sont compatibles avec la vie de l'homme. Puis, les chercheurs ont commencé à trouver des organismes qui survivent dans des conditions hors de ces normes, dans des milieux caractérisés par des conditions physiques et/ou chimiques extrêmes (**Peduzzi et al., 2006**).

Ces êtres exceptionnels qui défient les lois de la biologie et créent la vie où l'homme n'osait l'imaginer sont qualifiés d'extrêmophiles (**Echigo et al., 2005**) et ils ne sont pas seulement tolérants à ces conditions physiques (par exemple : la température, la pression, les radiations) et les conditions géochimiques (par exemple : la dessiccation, la salinité, le pH) (**Mesbah et al., 2009**).

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

Ces dernières années, la recherche sur la biodiversité microbienne des environnements hypersalins s'est multipliée. Le nombre des études visant une compréhension approfondie de ces écosystèmes comme le Grand lac salé, Utah (USA), la Mer Morte, les marais salants de plusieurs pays et les lacs alcalins à savoir le Lac Magadi à Kenya s'est considérablement développé (**D'Alessandro et al., 2006**).

La contamination de l'environnement par les métaux lourds provenant d'activités anthropiques et industrielles a causé des dommages considérables et irréparables aux écosystèmes (**Luciene et al., 2015**).

En plus d'être dangereux pour la santé humaine, ils ont également un effet néfaste sur la faune et la flore, et ils ne sont pas biodégradables par nature (**Luciene et al., 2015**).

Des micro-organismes sont présents dans les effluents industriels. Ils ont adopté différentes stratégies pour faire face aux effets nocifs de ces métaux (**Shamim, 2018**), il est impératif d'éliminer ou réduire la contamination par ces métaux lourds pour y parvenir, « la bioremédiation » est utilisée afin d'augmenter la stabilité du métal, ce qui réduit sa biodisponibilité (**Abbas et al., 2014**). Cependant, la biorestauration des environnements salins et hypersalins pollués par les métaux lourds avec des microorganismes conventionnels n'est pas possible en raison des salinités élevées de ces environnements qui peuvent perturber leur équilibre osmotique et dénaturer les enzymes métaboliques (**Erdogums et al., 2013**). Par conséquent, il existe un besoin pressant d'isoler des microorganismes extrêmement halophiles

pour la biorestauration d'environnement hypersalins pollués par les métaux lourds (**Naik et al., 2017**).

Afin de prouver la résistance de certaines bactéries halophiles aux métaux lourds, nous avons étudié la croissance cellulaire de plusieurs souches halophiles en présence de différentes concentrations du Mercure.

Les principales étapes de ce travail sont les suivantes :

- Revivification et vérification de la pureté des souches halophiles.
- Un suivi de la croissance bactérienne en présence de différentes concentrations de mercure.
- Dosage du mercure par dosage de la quantité de mercure restante par la technique ICP-MS.

Ce projet comprend trois chapitres principaux :

- Le premier chapitre représente une synthèse bibliographique qui décrit des généralités sur l'environnement hypersalin, les microorganismes extremophiles et sur les métaux lourds.
- Le deuxième chapitre représente tous le matériel et méthodes utilisés dans notre étude.
- Le dernier chapitre présente les résultats obtenus et leurs discussions.

A la fin, nous avons terminé notre travail avec une conclusion générale.



*Chapitre : Synthèse  
Bibliographique*

## 1 Les environnements hypersalins

### 1.1 Concentration en sels et composition ionique

Les environnements hypersalins sont essentiellement caractérisés par leur concentration totale en sels mais leur composition ionique, différente pour chacun, est un facteur clé pour déterminer le biotope de l'environnement (**Oren, 2006**). Les sels sont des composés ioniques de cations et d'anions formant un produit neutre et sans charge nette. Ces ions peuvent être minéraux ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ , etc) ou organiques (acétate, carbonate, citrate, nitrate) ainsi que monoatomiques ( $\text{F}^-$ ) ou polyatomiques ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Dans le cas des environnements hypersalins, le terme sel est utilisé pour définir une combinaison de différents anions et cations inorganiques parmi lesquels  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$  sont les plus abondants. On considère qu'un environnement est hypersalin quand la concentration en sels est supérieure à celle de l'eau de mer, qui est d'environ  $35 \text{ g.L}^{-1}$  (**DasSarma et DasSarma, 2012**). Cependant, la notion d'hypersalinité peut faire référence à des concentrations salines bien plus élevées, parfois même proches des conditions de saturation. Les environnements hypersalins sont nombreux et très répandus sur notre planète puisqu'on en retrouve sur chacun des cinq continents. Il existe deux types de milieux hypersalins, les environnements thalassohalins et athalassohalins, qui diffèrent selon leur composition ionique et sont colonisés par des organismes extrêmophiles que l'on appelle halophiles. (**Besse A., 2016**).

### 1.2 Environnements thalassohalins

Les environnements thalassohalins ont une composition ionique reflétant celle de l'eau de mer, avec des proportions de cations et d'anions similaires et une prédominance du  $\text{NaCl}$ . Le pH des environnements thalassohalins est légèrement alcalin, entre 7 et 8 (**Oren, 2006**). Les environnements thalassohalins peuvent être d'origine anthropique, comme les marais salants, ou bien d'origine naturelle, comme les sebkhas ou les lagons. (**Besse A., 2016**).

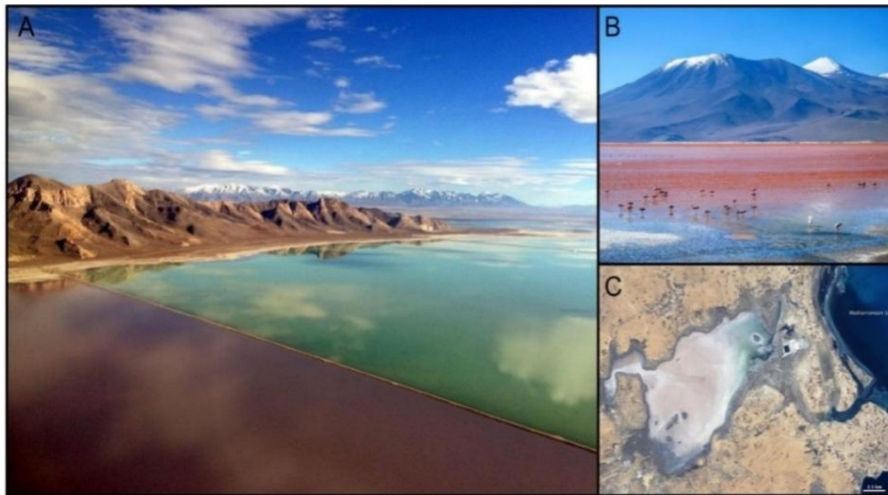
#### 1.2.1 Environnement thalassohalin d'origine anthropique : les marais salants

Les marais salants, ou salins, sont une succession de bassins d'évaporation créés par l'Homme et qui servent à la production de sels à partir de la concentration des sels présents dans l'eau de mer (**DasSarma et DasSarma, 2012**). Il existe un degré croissant de salinité à travers les différents bassins d'évaporation : les bassins les plus proches de la mer ont une concentration saline identique à celle de la mer, plus l'on s'éloigne de la mer, sous l'effet de l'évaporation de l'eau par le soleil (et la diminution de la profondeur des bassins), plus la concentration en sels augmente dans les différents bassins d'évaporation jusqu'au bassin de cristallisation (conditions saturantes) où le sel est récolté (**Oren, 2006**). Au fur et à mesure de l'évaporation de l'eau, la

composition ionique est modifiée : la limite de solubilité du sulfate de calcium  $\text{CaSO}_4$  qui précipite sous forme de gypse est atteinte lorsque la concentration en sels est d'environ 100-120  $\text{g.L}^{-1}$ . Dans les bassins de cristallisation, la composition ionique est encore différente puisque les concentrations en calcium et en sulfate sont réduites (de façon minimale pour le sulfate) jusqu'à atteindre le dernier bassin de cristallisation où le  $\text{NaCl}$  précipite en halite et où les concentrations relatives de  $\text{K}^+$  et  $\text{Mg}^{2+}$  augmentent (Oren, 2006).

### 1.2.2 Environnement thalassohalin d'origine naturelle : les sebkhas, lacs intérieurs et lagons.

Les environnements hyper salins thalassohalins d'origine naturelle peuvent être des lacs intérieurs, comme le Grand Lac Salé aux Etats-Unis (Great Salt Lake) ; des lagons, qui désignent une étendue d'eau peu profonde fermée au large du littoral par un récif corallien ou encore des « sebkhas », bassins à forte salinité occupant le fond d'une dépression séparés d'un milieu marin retrouvé dans les régions désertiques (Figure 1) (Oren, 2006). Ces bassins sont retrouvés dans les zones arides des pays du Maghreb ou le long des côtes du golfe persique dans les Emirats Arabes Unis.



**Figure 1** : environnement hypersalins thalassohalins.  
A : grand lac salé, USA (crédit photo : patrickwiggins).  
B : Lagunacolorada, Bolivie (crédit photo : Explore gram)  
C: Sebkhas El Melah, Tunisie (crédit photo: Earth Observatory).

### 1.3 Environnements athalassohalins

Les environnements athalassohalins ont une composition ionique différente de celle de l'eau de mer et dérivent de sources d'eau douce (torrents de montagne...). L'environnement hypersalin le plus étudié au monde est d'origine athalassohaline. Il s'agit de la Mer Morte : un lac fermé partagé entre la Jordanie et la Palestine où la concentration saline est de 340  $\text{g.L}^{-1}$

**(Figure 2).** Dans ce lac, les cations divalents dominent : les concentrations de  $Mg^{2+}$  ( $45,93 \text{ g.L}^{-1}$ ) et  $Ca^{2+}$  ( $63,97 \text{ g.L}^{-1}$ ) sont supérieures à celle du  $Na^+$  ( $38,88 \text{ g.L}^{-1}$ ) et  $K^+$  ( $7,82 \text{ g.L}^{-1}$ ). A cause de la forte concentration calcique, la solubilité du sulfate est faible et les anions monovalents  $Cl^-$  et  $Br^-$  représentent plus de 99 % des anions totaux. Le pH de la Mer Morte est relativement faible, de l'ordre de 5,8-6 (**Oren, 2006**). Il existe également des environnements athalassohalins alcalins : des lacs de soude sont présents dans de nombreuses régions telles que l'Afrique de l'Est (Lac Magadi et d'autres lac au Kenya et Tanganika), dans le désert Ouadi Natroun en Egypte ainsi qu'aux Etats-Unis, Inde, Chine, (**Tableau I**). A cause du pH élevé, 10-11 ou plus, les cations divalents  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  sont très peu solubles et la concentration de ces ions est en dessous du seuil de détection. Ces lacs sont riches en ions carbonates et bicarbonates, responsables de l'alcalinité du lac, et qui représentent une partie importante des anions totaux, en plus du  $Cl^-$  et sulfate. (**Besse A., 2016**).

Cependant, une des différences les plus importantes entre les plans thalassohalins et athalassohalins est le pH. Comme mentionné précédemment, les eaux thalassohalines sont légèrement plus alcalines que l'eau de mer à partir de laquelle elles ont été établies. Cela est principalement dû à la précipitation des carbonates de calcium en excès sous forme de calcite. Dans les systèmes athalassohalins, les eaux sont typiquement déficientes en  $Ca^{2+}$ , et  $Mg^{2+}$  ainsi, le système tend à générer un pH acide (**Grant et McGenity., 1998**).



**Figure 2 :** Environnements hyper salins athalassohalins : la Mer Morte.  
**Crédit photo: Seacret: minerals from the Dead Sea**  
(<http://www.seacretspa.com/The-Dead-Sea>).

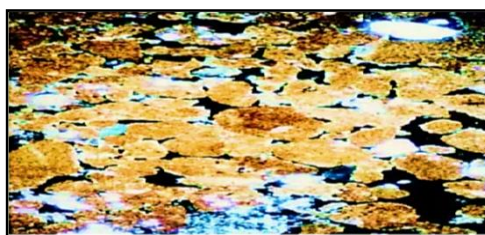
**Tableau I :** Composition ionique d'environnements thalassohalins et athalassohalins

Composition ionique	Lac Magadi (Kenya) (g <sup>l-1</sup> )	Lac Natrum Zugm (Egypte) (g <sup>l-1</sup> )	Grand lac Salé Arm (USA) (g <sup>l-1</sup> )	Mer Morte (g <sup>l-1</sup> )	Mer (g <sup>l-1</sup> )	Bassin de cristallisation San Diego (USA) (g <sup>l-1</sup> )
Na <sup>+</sup>	46.0	142.0	105.4	40.1	10.6	120.0
K <sup>+</sup>	0.06	2.3	6.7	7.65	0.8	52.0
Ca <sup>2+</sup>	0.0007	0.0	0.3	17.2	0.40	3.01
Mg <sup>2+</sup>	-	0.0	11.1	44.0	1.27	14.4
Cl <sup>-</sup>	14.0	154.6	181	224.9	18.9	210.0
CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	34.9	67.2	0.27	0.077	0.14	24.5
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	-	22.6	27.0	0.45	2.65	-
Azote total	0.038	-	4.3-7.2	-	-	-
pH	10.35	11.0	7.7	5.9-6.3	8.1	-
Références	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)

(-) : non déterminé. (1) : Grant &Tindall (1986). (2) : Larsen (1980). (3) : Post (1977). (4) : Beyth (1980). (5) : Brock *et al.* (1994). (6) : Javor (1983).

#### 1.4 Les Sols salés

Les sols sont considérés comme salins lorsqu'ils contiennent un excès en sels solubles, dans la plupart comprenant les chlorures, les sulfates et les bicarbonates de sodium, de calcium et de magnésium, leur salinité est supérieure à 0.2% (p/v) (Ghassemi *et al.*, 1995) (figure 3 et figure 4).



**Figure 3 :** pseudo-sables très salés et sodiques de la lunette d'elmabtouh (basse vallée de la medjerda) (Hachicha ,2007).



**Figure 4 :** sols salés et sodiques des sebkhas en tunisie (Hachicha ,2007).

## 2 Les microorganismes extrêmophiles

### 2.1 Le monde des extrêmophiles

Un environnement est qualifié d'extrême lorsque les paramètres physico-chimiques qu'il renferme sont le plus souvent hostiles à la vie conduisant en une spécialisation et/ou une diminution de la biodiversité existante : pH inférieur à 5 ou supérieur à 9, pression supérieure à 20 MPa (megapascal), température supérieure à 50°C ou inférieure à 10°C, et des concentrations en sels supérieures à 3-4 % en NaCl jusqu'à saturation (35 % en NaCl) (**Gregoire et al., 2009**).

#### 2.1.1 Les microorganismes halotolérants et halophiles

Les bactéries halophiles sont des bactéries qui ne peuvent croître qu'en présence de sel généralement sous forme de chlorure de sodium (NaCl). Les bactéries halophiles sont classées en trois catégories : les légèrement halophiles (optimum de croissance entre 2 et 5 % de NaCl), les modérées halophiles (optimum de croissance entre 5 et 20 % de NaCl), et les halophiles extrêmes (optimum de croissance entre 20 et 30 % de NaCl). La majorité des halophiles habitent le milieu marin où la concentration est voisine de 3,5% en sel. Il existe cependant des habitats plus spécifiques et plus localisés tels que les marais salants ou les lacs salés colonisés par les micro-organismes hyperhalophiles. (**Gregoire et al., 2009**)

La composition physico-chimique notamment de ces lacs varie avec la topographie environnante et la géologie. Nous nous intéresserons tout particulièrement à ces lacs salés. Il en existe deux types, ceux formés par évaporation totale principalement d'eau de mer, et ceux formés par évaporation d'eaux résultant du lessivage des roches par la pluie. Dans ce dernier cas, la composition physico-chimique de l'eau est influencée par les couches géologiques traversées par ces eaux. On trouve par exemple les lacs sulfatés et les lacs alcalins (pH compris entre 9 et 12) contenant majoritairement du carbonate et une absence totale de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  car ils précipitent dans de telles conditions de pH. (**Gregoire et al., 2009**)

Les micro-organismes halophiles appartiennent aux trois domaines du vivant (*Bacteria*, *Archaea*, *Eucarya*) (**Kamekura M., 1998**). Les bactéries halophiles (modérées et extrêmes) anaérobies appartiennent à l'ordre des *Halanaerobiales* (**Ollivier B, Caumette P, Garcia JL et Mah RA., 1994**) qui comprend deux familles : les *Halanaerobiaceae* et les *Halobacteroidaceae* dont les espèces fermentent les hydrates de carbone à l'exception d'une bactérie homoacétogène qui réduit le  $\text{CO}_2$  en acétate et croît sur bétaine et triméthylamine, *Acetohalobium baticum*. La plupart de ces espèces sont des modérées halophiles avec un optimum de croissance entre 3 et 25 % de NaCl. On retrouve également dans le domaine des

*Bacteria*, des micro-organismes sulfato-réducteurs modérés halophiles pouvant croître jusqu'en présence de 24 % de NaCl. Ils appartiennent en particulier au genre *Desulfohalobium* et oxydent incomplètement leurs substrats. Chez les *Archaea*, les *Methanoarchaea* anaérobies sont spécialisées dans l'utilisation de composés méthylés. En ce qui concerne les aérobies hyperhalophiles, ils appartiennent à la famille des *Halobacteriaceae*. Ils nécessitent un minimum de 10 % de NaCl pour croître et sont hétérotrophes. Certains de ces micro-organismes peuvent avoir un métabolisme fermentaire. Enfin, des organismes eucaryotes peuvent s'adapter ou survivre dans ces écosystèmes hypersalés, il s'agit d'algues, de diatomées, de proto-zoaires ou même de champignons. (Gregoire *et al.*, 2009).

Ces microorganismes extrémophiles colonisent différents environnements décrit ci-dessous :

- Les micro-organismes psychrophiles, thermophiles et hyperthermophiles, piézophiles, acidophiles et alcalophiles. (Tableau II)

**Tableau II** : Conditions extrêmes les plus fréquemment retrouvées et exemple d'organismes colonisateurs. (A, besse (2016)).

Paramètre environnemental	Condition optimale	Nom	Exemple
<b>Température (partie 2.1.1)</b>	Supérieur à 80°C	Hyparthermophiles	<i>Sulfolobus</i> , <i>Pyrococcus</i> , <i>Pyrolobus</i> , <i>Methanopyrus</i> .
	Entre 50 et 80°C	Thermophiles	<i>Thermoplasma acidophilum</i> <i>Picrophilus torridus</i> .
	De 5°C à 25°C	Psychrotrophes (tolérants)	<i>Yersinia enterocolitica</i> .
	Inférieur à 15°C	Psychrophiles	<i>Micrococcus cryptophilus</i> <i>Rhodococcus erythropis</i>
<b>pH (partie 2.1.2)</b>	pH < 2	Acidophiles	<i>Pycrophilus oshimae</i> <i>Pycrophilus torridus</i>
	pH > 10	Alcalophiles	<i>Bacillus alcalophilus</i> , <i>Natrialbales</i>
<b>Salinité (partie 3)</b>	2,5 M à 5M NaCl	Halophiles	<i>Halobacteriales</i> <i>Natralbales</i> <i>Haloferacales</i>
<b>Pression hydrostatique (partie 2.1.3)</b> <b>Eléments externes (partie 2.1.4)</b>	0.1 MPa ou plus	Piezotolérant (tolérants)	<i>Dermacoccus abyssi</i>
	> 0,1 MPa Forte concentrations en métaux lourds Radiations ionisantes	Piezophiles Metalophiles Radiophiles	<i>Marinitoga piezophila</i> <i>Alcaligenes eutrophus</i> <i>Cupriavidus metallidurans</i> <i>Deinococcus radiodurans</i> <i>Deinococcus radiophilus</i> <i>Rubrobacter radiotolerans</i>

## 2.2 Diversité phylogénétique des halophiles

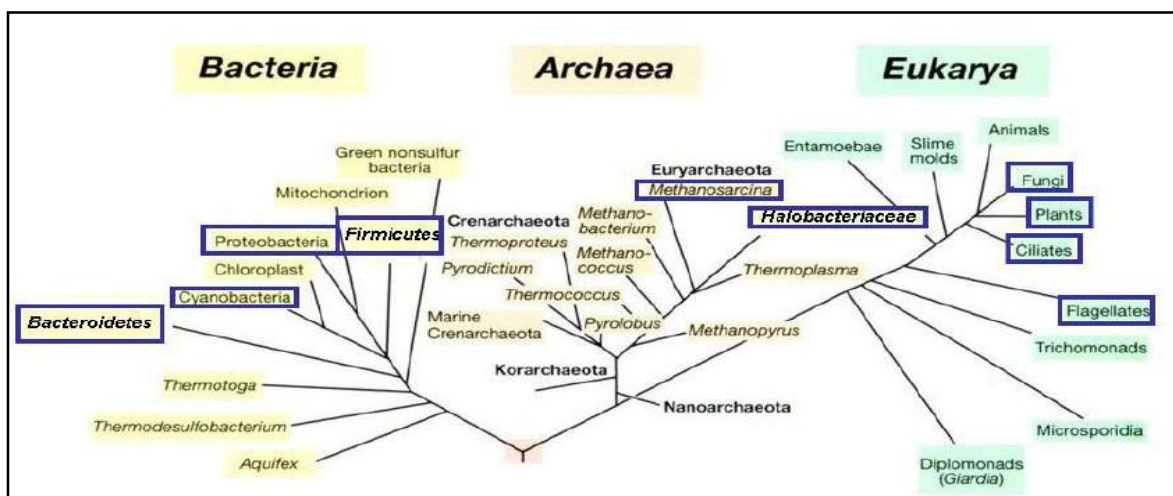
Les organismes halophiles peuvent être rencontrés dans les trois domaines de la vie : *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya* (Oren., 2008) (figure 5). Le terme «halobactéries» est le nom informel utilisé pour décrire les membres de la famille *Halobacteriaceae*, la seule famille dans l'ordre Halobacteriales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

### 2.2.1 Archaea halophiles

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

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

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



**Figure 5** : La distribution de microorganismes halophiles dans l'arbre du vivant (Oren, 2008).

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

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

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

La famille des *Halobacteriaceae* comprend des halophiles aérobies, répartis au sein de 27 genres (**De la Haba et al., 2011**): *Haladaptatus*, *Halalkalicoccus*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobaculum*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Halomicrobium*, *Halopiger*, *Haloplanus*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halosarcina*, *Halosimplex*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Halovivax*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronolimnobius*, *Natronomonas* et *Natronorubrum*. Avec la description de *Halonotius* (**Burns et al., 2010**), de *Halopelagius*, *Halolamina*, *Halorussus*, *Halogramum*, *Halobellus*, *Halorientalis* (**Cui et al., 2010a ; 2010b ; 2010c**), *Halomarina* (**Inoue et al., 2010**), *Halarchaeum* (**Minegishi et al., 2010**) et de *Natronoarchaeum*, *Salararchaeum* (**Shimane et al., 2010; 2011**), le nombre est passé à 38 genres. Avec le développement des techniques de la biologie moléculaire, de nouvelles espèces bactériennes halophiles et halotolérantes ont été isolées dans divers environnements salins et hypersalins, elles sont incluses dans les 5 phyla du domaine des Bacteria : *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* et *Bacteroidetes* (**Oren, 2002**).

### 2.2.2 Eucaryotes halophiles

Avec quelques exceptions notables, les microorganismes eucaryotes forment un groupe tristement négligé, tant par l'étude de leur distribution dans des environnements hyper-salins que leur adaptation physiologique. Les algues vertes unicellulaires du genre *Dunaliella* sont examinées de façon détaillée, étant donné qu'ils sont les principaux ou uniques « acteurs » dans beaucoup d'environnements hypersalins (**Oren, 2008**). Ils sont d'avantage halotolérantes que

strictement halophiles et tolèrent une large gamme de salinité. On rencontre également dans ces environnements un crustacé du genre *Artemia* (*Artemia salina*, *Artemia franciscana*) (Oren, 2002a).

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

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

### 2.2.3 Bactéries halophiles

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

#### 2.2.3.1 Phylum *Proteobacteria*

Le phylum *Proteobacteria* a été proposé par Garrity *et al.* (2005) sur la base de l'analyse phylogénétique des séquences du gène codant l'ARNr 16S. Les microorganismes appartenant à ce phylum peuvent être isolés de divers environnements comprenant des habitats marins, hypersalins, alcalins et acides. La famille des *Halomonadaceae* de la classe *Gammaproteobacteria* contient le nombre le plus important d'espèces halophiles modérées (Franzmann *et al.*, 1988).

#### 2.2.3.2 Phylum *Firmicutes*

Les membres du phylum *Firmicutes* sont hautement diversifiés au niveau morphologique et physiologique et sont capables d'habiter une grande variété d'environnements tels que les habitats hypersalins. La famille des *Bacillaceae* appartenant à ce phylum est la plus importante avec 21 genres incluant des espèces halophiles obligatoires (Ludwig *et al.*, 2008).

Le genre *Halobacillus* a particulièrement retenu l'attention, des études physiologiques réalisées sur ce genre se sont focalisées sur l'espèce type *Halobacillus halophilus*. Plusieurs approches ont démontré l'importance du chlorure non seulement pour la croissance de cette bactérie mais également pour la mobilité et la synthèse flagellaire, la germination des endospores, la

régulation d'une variété de protéines et le transport de l'osmoprotecteur glycine bêtaïne (**Roeler et Müller., 1998, 2002 ; Dohrmann et Müller, 1999 ; Roeler et al., 2000**).

### 2.2.3.3 *Phylum Actinobacteria*

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

### 2.2.3.4 *Phylum Spirochètes*

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

### 2.2.3.5 *Phylum Bacteroidetes*

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

## 2.3 Adaptation des microorganismes halophiles et halotolérants à la salinité

Les microorganismes vivant en milieu salins et hypersalins rencontrent différentes difficultés qui sont la déshydratation, le stress osmotique et la faible activité d'eau ( $A_w$ ), pour cela ils ont développé plusieurs stratégies adaptatives (**Oren, 2002**).

Cette dernière forme un système en constante évolution mais qui en même temps possède une certaine homéostasie qui reflète les interactions entre tous les membres de cette communauté et l'habitat qu'ils occupent (**Alexander, 1997**). Aussi, la vie dans les lacs hypersalés n'est possible qu'aux prix d'une forte spécialisation qui n'est atteinte que par quelques microorganismes, capables de maintenir une pression osmotique égale à celle de l'environnement. Deux stratégies sont utilisées pour s'adapter au milieu hypersalé et donc à une faible activité d'eau ( $A_w$ ), elles sont basées sur le principe de créer une haute pression osmotique dans le cytoplasme tout en gardant une faible concentration en ions sodium ( $Na^+$ ) (**Oren, 2002**), en l'expulsant grâce à un anti port  $Na^+/H^+$  localisé au niveau de la membrane cytoplasmique (**Oren, 2001**).

### 2.3.1 Adaptation par accumulation de KCl

Cette stratégie implique l'accumulation des ions  $K^+$  et  $Cl^-$  pour maintenir l'équilibre osmotique. Elle est adoptée par les archées aérobies halophiles extrêmes de l'ordre des *Halobacteriales* et par les bactéries halophiles anaérobies fermentatives ou homoacétogènes de l'ordre des *Halanaerobiales*. Cependant, la présence intracellulaire de concentrations élevées de KCl exige une adaptation supplémentaire des machineries enzymatiques, aussi les protéines devraient maintenir leur activité et leur conformation appropriées (**Lanyi, 1974**). Les études de protéomique ont montré que leurs protéines sont hautement acides, et la plupart d'entre elles se dénaturent en présence de faibles concentrations en sel (**Kennedy et al, 2001**). Ainsi les études réalisées sur la malate déshydrogénase (*Hm MalDH*) d'*Haloarcula marismortui* (une haloarchaea), ont montré qu'elle contient plus de résidus acides (aspartique et glutamique) et hydrophobes mais moins de résidus basiques (lysine) que son homologue non halophile (**Madern et al, 1995**). Cette accumulation de résidus acides est donc un mécanisme d'adaptation aux fortes concentrations en sels. Cette enzyme est constituée de dimères reliés par un large réseau de molécules d'eau structurées dans la cavité centrale et par des ponts salins multiples aux deux extrémités. Ces derniers sont bloqués spécifiquement par des ions  $Cl^-$ , ce qui renforce leur stabilité en présence de concentrations salines élevées. De manière similaire, les ponts salins complexes entre les monomères des dimères sont fermés par des ions  $Na^+$ . Ces analyses révèlent que l'adaptation halophile ne vise pas tant à protéger la protéine des fortes concentrations en sel, mais au contraire à l'exploiter (**Costenaro, 2001**).

### 2.3.2 Adaptation par production et accumulation d'osmoprotecteurs

Cette stratégie est rencontrée chez la plupart des bactéries halophiles, elle est basée sur l'exclusion de sodium et l'accumulation ou la production de composés organique de faible poids moléculaire solubles dans l'eau « solutés compatibles » pour éviter la perte d'eau (**Galinski, 1993**). Ce mécanisme est largement utilisé dans les trois domaines de vie *Archaea* ; *Eucarya* et *Bacteria*.

Il existe une large variété de solutés, des polyalcools et des sucres (**Galinski, 1995**), qui peuvent être synthétisés par les microorganismes ou importés de l'environnement externe, par des systèmes de transports sans qu'ils interfèrent avec leur métabolismes (**Brown, 1976**).

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

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

La stratégie d'osmoadaptation chez les bactéries halotolérantes et modérément halophiles consiste en premier lieu en l'accumulation d'ions  $K^+$  et de glutamate (réponse primaire) (Sleator et Hill, 2001 ; Le Rudulier *et al.*, 2002) puis des solutés organiques, non chargés, de faible poids moléculaire si le choc persiste ou augmente (réponse secondaire) (Lucht et Bremer, 1994 ; Bartlett et Roberts, 2004). En absence de solutés adéquates, l'eau s'échappe de la cellule afin d'équilibrer l'activité de l'eau aux deux côtés de la membrane, ce qui conduit à la réduction du volume de la cellule, altérant les concentrations intracellulaires des métabolites et l'activité des enzymes (Shindler *et al.*, 1997 ; Litchfield, 1998 ; Roberts, 2006).

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

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

Les microorganismes halophiles ou halotolérants utilisant le mécanisme de la production ou l'accumulation de solutés compatibles sont plus flexibles pour l'adaptation à la pression osmotique que les microorganismes utilisant les mécanismes de l'accumulation de KCl (Kunte *et al.*, 2002) également, l'adaptation à salinité par l'accumulation de solutés organiques nécessite moins d'adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire que la stratégie de l'accumulation des ions potassium, cependant la production des solutés est énergétiquement coûteuse (Oren, 2002).

#### 2.4 Diversité métabolique des halophiles

La diversité phylogénétique dans les environnements hypersalins s'accompagne d'une diversité métabolique. De nombreux processus métaboliques ayant lieu dans les niches écologiques à faible teneur en sel ne se produisent pas au-dessus de 100 à 150 g/l. Des exemples à cela sont donnés par la nitrification autotrophe, la méthanogénèse et l'oxydation aérobie du méthane (Oren, 2011).

La plupart des microorganismes halophiles et halotolérants décrits sont des hétérotrophes aérobies, trouvés dans les trois domaines de la vie. Dans les environnements avec des concentrations en sel jusqu'à 200-250 g/l, les représentants de bactéries sont responsables de la majeure partie de l'activité hétérotrophe (Oren, 2006).

Aux fortes salinités, les groupes comme les *Halomonadaceae* ne fonctionnent plus et la dégradation aérobie des composés organiques est assurée par deux groupes de procaryotes : *Halobacteriaceae* (*Archaea*) et *Salinibacter* (*Bacteria*) (**Oren, 2006a**).

D'autres modes métaboliques existent aussi tels que la respiration anaérobie dont les accepteurs finaux d'électrons utilisés incluent non seulement le nitrate et le sulfate, mais aussi des composés non communs comme l'arséniate et le séléniate. Ce mode est utilisé par plusieurs membres modérément halophiles de la famille des *Halomonadaceae* (**Ventosa et al., 1998**).

Certaines *Archaea* halophiles (*Haloarcula marismortui*, *Haloarcula vallismortis*, *Haloferax mediterranei*) peuvent croître également de façon anaérobie sur le nitrate s'il est présent, en formant le nitrogène gazeux et/ou le protoxyde d'azote (**Mancinelli et Hochstein, 1986**).

Des halophiles fermentatifs sont inclus dans des groupes disparates. Les *Archaea* de la famille *Halobacteriaceae* sont fondamentalement des aérobies en utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Cependant, quelques espèces peuvent se développer en anaérobiose par la dénitrification ou en utilisant l'énergie lumineuse absorbée par la bactériorhodopsine. Les espèces du genre *Halobacterium* peuvent se développer dans des conditions anaérobies à l'obscurité tout en puisant leur énergie par fermentation de l'arginine avec la production de l'ornithine, de l'ammoniaque et du dioxyde de carbone (**Hartmann et al., 1980**).

Un autre représentant des *Halobacteriaceae* qui se développe probablement par la fermentation est *Halorhabdus tiamatea*, isolé d'un bassin anoxique hypersalin profond de la Mer Rouge. Il se développe seulement sur des substrats complexes mais aucun mode de fermentation n'a été constaté (**Antunes et al., 2008**).

La fermentation est utilisée par des halophiles fermentatifs classés principalement dans les deux familles, *Halanaerobiaceae* et *Halobacteroidaceae* (**Rainey et al., 1995**), en plus de quelques procaryotes fermentatifs du phylum *Firmicutes* (*Clostridium halophilum*) (**Antunes et al., 2009**).

### 3 Les métaux lourds

La classification périodique des éléments chimiques selon Mendeleïev regroupe des métaux et des non-métaux. Chacun de ces deux groupes présente des propriétés physiques et chimiques différentes. Les métaux ont aujourd'hui tendance à être classés en fonction de leur potentialité à établir des liaisons thermodynamiques stables avec un ligand organique (**Nieboer et Richardson, 1980**). A l'exception du béryllium et de l'aluminium, la plupart des métaux sont à l'état ionique des acides faibles de Lewis (**Lewis, 1923**). Pearson a proposé en 1968 une classification des accepteurs de paires d'électrons (acides de Lewis) en trois catégories :

- les accepteurs "durs" sont regroupés dans la classe A. On y trouve les alcalins, les alcalino-terreux, les lanthanides et les actinides. Les accepteurs de cette classe forment des liaisons ioniques avec leurs ligands organiques. On y trouve les ions :  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . (**Nieboer et Richardson, 1980**).
- les accepteurs "mous" sont regroupés dans la classe B. Les accepteurs de cette classe forment des complexes essentiellement covalents avec leurs ligands. On y trouve les ions  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Pt}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$  et  $\text{Bi}^{2+}$ . (**Nieboer et Richardson, 1980**).
- les accepteurs "intermédiaires" parmi lesquels on trouve la plupart des métaux ayant des effets toxiques ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Ni}^{2+}$ ), et dont la réactivité avec les molécules cibles organiques est extrêmement polymorphe. (**Nieboer et Richardson, 1980**).

Cette classification se réfère dans chaque cas à un ion spécifique, de telle sorte que si le métal existe dans plus d'un état d'oxydation, chaque forme ionique doit être traitée séparément. Dans ces cas, l'ion ayant la plus forte charge possède les caractéristiques de la classe A (ou au moins de faibles propriétés de la classe B), alors que dans l'état d'oxydation le plus faible, l'inverse est vrai. Bien que ce schéma de classification ne soit pas absolu (de par la présence du groupe des accepteurs "intermédiaires"), et que certains auteurs auraient tendance à placer le même ion métallique dans des classes différentes, il est en général accepté (**Nieboer et Richardson, 1980**).

Parmi les polluants contaminants l'environnement, l'accent est mis ces dernières années sur les métaux lourds (**Naseem et Tahir, 2001**), qui sont devenu l'un des problèmes les plus graves, en raison de leur grande toxicité pour de nombreuses formes de la vie (**Ys Ho et al., 2002**). Les métaux lourds sont des produits chimiques denses, ils sont considérés comme des micronutriments, (tel que le cuivre et le chrome qui sont des oligoéléments essentiels à l'homme) et comme un intoxicant (plomb et mercure) (**Voica et al., 2016**). Ces métaux sont présent à l'état naturel dans les roches, l'eau, l'air et le sol, ils sont également produits par les activités humaines notamment les activités industriels et minières (Interface de santé et environnement, 2002).

### 3.1 Définition des métaux lourds

Jusqu'à présent il n'existe pas de définition générale, mais selon GADD (1992) et NIES (1999), les métaux lourds regroupent les 53 métaux dont la densité est supérieure à  $5 \text{ g/cm}^3$ . Ils ont en commun les propriétés d'être cristallins à température ambiante, à l'exception du mercure (Hg) qui est liquide, ductiles et malléables et surtout d'avoir une bonne, voire excellente conductivité thermique et électrique, ce qui explique leur utilisation dans de nombreuses industries

notamment en métallurgie sous forme de divers alliages (HAMMI, 2010). En fait, dans la plupart des cas beaucoup d'auteurs utilisent ce terme, à tort et à travers, pour caractériser l'ensemble des métaux et métalloïdes présentant un caractère toxique pour la santé et l'environnement. Le plomb (Pb), mercure (Hg), l'arsenic (As) et le cadmium (Cd) sont les plus souvent considérés comme toxique pour l'homme (NIES, 1999). D'autres comme le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le chrome (Cr) et le nickel (Ni), pourtant assimilés à des oligoéléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires, peuvent devenir toxiques à doses plus importantes (LOVLEY et LLOYD, 2000). A concentration élevée, les métaux détruisent les cellules par la destruction des membranes cellulaires, l'altération des enzymes spécifiques ou dénaturation de l'ADN (Nite, 1999 ; Hobman et crossman, 2015).

### 3.2 Classification des métaux lourds

Ces éléments de traces métalliques ont des effets très différents sur le milieu vivant. Quelques-uns sont nécessaires pour les organismes : ils sont dits « **essentiels** ». Bien qu'à des fortes concentrations, ils peuvent être nocifs pour les organismes. Parmi ces éléments qui sont essentiels (micronutriments), et dont l'absence entrave le fonctionnement ou empêche le développement d'un organisme, on trouve le Fer (Fe), Le Manganèse (Mg), le Zinc (Zn) et le cuivre (Cu) pour les plantes et les animaux. Par ailleurs, le Cobalt (Co), le Chrome (Cr) et le selenium (Se) sont essentiels seulement pour les animaux, alors que Molybdène (Mo) est un micronutriment pour les végétaux. Ces éléments constituent des enzymes et protéines qui sont très importantes dans les processus métaboliques des organismes (Alloway et Ayres, 1997).

Selon ces auteurs, si ces éléments se trouvent être en fortes concentrations, ils peuvent devenir toxiques pour les organismes.

D'autres éléments chimiques, qui ne présentent pas une fonction métabolique, sont connus comme « **non essentiels** » et généralement ont un seuil de concentration beaucoup plus bas pour devenir toxiques (OPS, 1987 ; Alloway et Ayres, 1997 ; Ingersoll et al., 2000 ; Chiffoleau et al., 2001). Ces éléments non essentiels sont : Arsenic (As), Cadmium (Cd), Plomb (Pb), Uranium (U), Mercure (Hg), Antimoine (Sb), Titane (Ti) et plutonium (Pu).

### 3.3 Origine des métaux lourds

#### 3.3.1 Origines naturelles

A la différence des molécules de synthèse produites par l'homme, les métaux sont présents de façon naturelle et normale dans la croûte terrestre, combinés avec d'autres éléments pour former des composés chimiques stables. Le fond géochimique définit la teneur naturelle ou originelle

en métaux trouvée dans le sol en l'absence de tout processus d'apport ou d'exportation vers ou hors d'un site considéré. Cette teneur dépend de la teneur dans la roche qui est à l'origine du sol, mais également des processus qui sont intervenus lors de la Formation du sol, qui ont pu lessiver ou plus généralement concentrer le métal en question (**Robert, 1996**).

L'énergie de liaison entre les métaux lourds naturels et le sol est très élevée par rapport à celle des sources anthropiques. Les comètes, l'érosion, les éruptions volcaniques et l'altération des minéraux sont des exemples de processus naturels qui provoquent l'apparition de métaux lourds dans l'environnement (**Ayangbenro et Babalola ., 2017**).

### 3.3.2 Origines anthropiques

Les métaux sont utilisés dans l'économie mondiale, et l'extraction et l'utilisation de matière première comme les combustibles fossiles ou les engrais interviennent comme source de contamination. Il est préférable d'employer le terme "contamination" quand il s'agit de désigner l'accroissement notable de la concentration d'un élément dans l'environnement, au-delà des valeurs auxquelles on le rencontre le plus fréquemment (**Alloway, 1995**).

Le développement intensif de différents industries comme celles de l'agriculture et de l'utilisation massive des engrais, des pesticides et de l'épandage de boues d'épuration, l'industrie et le rejet de poussières contenues dans les fumées émises, ou bien le rejet d'effluents liquides ou gazeux, l'urbanisation et les décharges de déchets urbains bruts, l'augmentation de la circulation automobile et de la combustion de sources d'énergie fossile, ont conduit à une augmentation de la pollution par les métaux lourds. Il convient généralement de distinguer entre les pollutions locales, les pollutions de proximité et les pollutions à grande distance (**Bourrelier et Berthelin, 1998**) (**Tableau III**).

Le cadmium par exemple est généré par l'exploitation minière, les activités industrielles, les boues d'épuration et l'utilisation d'engrais phosphatés dans l'agriculture. Il est l'un des métaux lourds les plus toxiques et il est classé numéro 7 parmi les 20 principaux toxiques (**Alkhedhairy et al., 2006**).

Le zinc et les nanoparticules d'oxyde de Zinc (ZnONps) aussi sont très préoccupantes en raison de leur demande croissante en galvanoplastie, galvanisation, cosmétique, filtres salaires, peinture, industrie alimentaire, médicaments anticancéreux et antimicrobien, céramique et anti conducteurs (**Monteiro et al., 2011 ; Li et al., 2011**). Les ZnONps ont été largement étudiés

pour leur effet antifongique (*Candida albicans*), antibactérien (*Escherichia coli*), et antiviral (Bacteriophages MS2). (Lipovsky et al., 2011 ; You et al., 2011).

L'exploitation minière (essentiellement concentrée sur l'extraction des métaux comme Au, Ag, Fe, Cu, Pb, Zn, Cr, Hg), la fabrication et l'utilisation de produits synthétiques, (pesticides, peintures, piles, déchets industriels et terres) peut entraîner aussi la contamination des sols urbains et agricoles par les métaux lourds (Annikadurve et al., 2009). Plomb, mercure, arsenic et le cadmium sont des métaux lourds biologiquement non essentiels et toxiques qui affectent le biote terrestre et aquatique (Tableau IV).

**Tableau III : classification des pollutions anthropiques. (Modifié, d'après Bourrilier & Berthelin, 1998).**

Origine	Type	Pollution localisée	Pollution de proximité	Pollution à grande distance
Industries	Sites anciens	Déchets	Voie atmosphérique et aquatique	
	Site actuels	Exceptionnellement déchets	Voie atmosphérique, exceptionnellement aquatique	
Consommation	Transport, vie urbaine, tourisme	Déchets	Voie atmosphérique et aquatique	Voie atmosphérique (transport)
Mines		Déchet et voie aquatique		
Agriculture		Epannage, intrants et voie aquatique		

**Tableau IV** : Sources industrielles et agricoles des métaux présents dans l'environnement. (J.M Brigon *et al*, 2005).

Utilisation	Métaux
Batteries et autres appareils électriques	Cd, Hg, Pb, Zn, Mn, Ni
Pigments et peintures	Ti, Cd, Hg, Pb, Zn, Mn, Sn, Cr, Al, As, Cu, Fe
Alliages et soudeurs	Cd, As, Pb, Zn, Mn, Sn, Ni, Cu,
Biocides (pesticides, herbicides)	As, Hg, Pb, Cu, Zn, Mn, Sn,
Agents de catalyse	Ni, Hg, Pb, Cu, Sn,
Verre	As, Zn, Sn
Engrais	Cd, Hg, Pb, Al, As, Cr, Mn, Sn, Ni, Cu
Matières plastiques Cd, Sn, Pb	Cd, Sn, Pb
Produits dentaires et cosmétiques	Sn, Hg
Textiles	Cr, Fe, Al
Carburants	Ni, Hg, Cu, Fe, Mn, Pb, Cd
Raffinerie	Ni, V, Pb, Fe, Mn, Zn

### 3.4 Exemples des métaux lourds

#### 3.4.1 Plomb

Le plomb est un élément chimique de symbole Pb et de numéro atomique 82. Le plomb se trouve naturellement à l'état de trace : La concentration moyenne dans la croûte terrestre est approximativement de 20 ppm. L'érosion et les émissions volcaniques comptent pour la plupart des processus naturels mobilisateurs de Pb, mais les activités humaines sont de loin beaucoup plus significatives dans la mobilisation de Pb que les processus naturels (**Wright et Welbourn, 2002**).

L'histoire de l'utilisation humaine du plomb remonte à 4000 ans. Les records d'utilisation de ce métal doux et facilement malléable remontent à l'époque des Egyptiens et des Babyloniens. Les premiers usages incluent la construction et l'utilisation des tuyaux pour la collecte, le transport et la distribution de l'eau. À travers le Moyen-âge et au-delà, le plomb est utilisé pour couvrir les matériaux. L'usage le plus marqué de ce produit est l'emploi du tétraéthyl de plomb, comme anti-détonnant, dans les carburants. D'autres usages du plomb incluent : acétate de plomb (édulcorant), sels de plomb (pigments), soudure (conserves), batteries, bouclier pour la protection contre la radioactivité, et l'arséniat de plomb (insecticide). Le plomb est également utilisé dans les industries de la céramique et du cristal (aspect vitreux). Le plomb est

actuellement le 5ème métal le plus communément utilisé dans le monde (Wixson et Davies, 1993 ; Wright et Welbourn, 2002, Shotyk et Roux. 2005) (Tableau V).

Tableau V : Propriétés physicochimiques du plomb. (Tiré de J.K. Barbalaceinc., 2012).

Propriétés	Valeurs
Masse molaire	207.2 g/mol
Pression de vapeur	$4.2 \times 10^{-7}$ Pa à 327.6 °C
Solubilité dans l'eau	Non soluble à 20°C
Etats d'oxydation	3(0, +2 et +4)

### 3.4.2 Mercure

Le mercure est un élément chimique de symbole Hg et de numéro atomique 80. L'abondance de mercure dans la croûte terrestre atteint 0,08 ppm. Sa concentration dans les sols non contaminés se situe à 0.007 ppm et dans les eaux douces peut varier de 0,01 à 10 ppm, bien que des concentrations aussi élevées que 1600 ppm ont été mesurées dans des eaux au contact avec les dépôts du cuivre dans l'Oural du sud (Ehrlich, 2001). Dans la nature, le mercure peut exister comme métal ou incorporé à des composés inorganiques et organiques. Le métal est liquide à température ambiante et a une pression de vapeur significative ( $1,2 \times 10^{-3}$  mm Hg à 20°C) et une chaleur de vaporisation de 14,7 cal. mol<sup>-1</sup> à 25 °C.

Le minéral le plus abondant à base de mercure est le cinabre (HgS) (Ehrlich, 2001). Le mercure présent dans l'environnement résulte de processus naturels (émissions volcaniques). Les usages du mercure sont multiples et contribuent pour une grande part à la pollution de l'environnement. Il est employé comme électrode dans la préparation de la soude. Il est aussi utilisé comme catalyseur dans l'industrie chimique. Le mercure est également employé en cosmétique, en pharmacie (mercurochrome, mercyl, etc.), dans les peintures antifongiques destinées au traitement des bois de construction (revêtements, charpentes, etc...). Les fongicides organomercuriels utilisés pour le contrôle des moisissures et divers agents phytopathogènes sont aussi une source importante de contamination de l'environnement. La combustion des énergies fossiles représente une source majeure de contamination de la biosphère (Ehrlich, 2001, Wright et Welbourn, 2002) (Tableau VI).

**Tableau VI** : Propriétés physicochimiques du Mercure. (Tiré de J.K. Barbalaceinc., 2012).

Propriétés	Valeurs
Masse molaire	200.59 g/mol
Pression de vapeur	0.0002 Pa à -38.72 °C
Solubilité dans l'eau	Non soluble à 20°C
Etats d'oxydation	3(0, +1 et +2)

### 3.4.3 Cadmium

Le cadmium est un élément chimique de symbole Cd et de numéro atomique 48. Un métal à l'état de trace et relativement rare, a pris de l'importance comme contaminant de l'environnement seulement au cours des 60 dernières années voire plus. C'est un sous-produit commun de l'exploitation minière et des opérations de fusion du zinc, et d'autres métaux non ferreux. Les usages du cadmium se situent principalement en électricité (accumulateurs Ni-Cd), en électronique (photopiles), et en métallurgie (traitement des surfaces par cadmiage électrolytique et galvanoplastie). Aussi, l'industrie des matières plastiques emploie, toute proportion gardée, des quantités relativement importantes de cadmium comme pigment. Le stéarate de cadmium est employé comme agent stabilisateur de certains polymères. Les énergies fossiles et leurs dérivés, comme pour le mercure et le plomb, l'incinération des déchets, et la fabrication de l'acier constituent des sources non négligeables de la pollution de l'environnement (Wright et Welbourn, 2002) (Tableau VII).

**Tableau VII** : Propriétés physicochimiques du Cadmium. (Tiré de J.K. Barbalaceinc., 2012).

Propriétés	Valeurs
Masse molaire	112.41 g/mol
Pression de vapeur	$7.5 \times 10^{-3}$ mmHg à 257 °C
Solubilité dans l'eau	Non soluble à 20°C
Etats d'oxydation	2(0 et +2)

### 3.4.4 Le Zinc

Le zinc est un élément chimique, de symbole Zn et de numéro atomique 30. Le zinc est un métal, moyennement réactif, qui se combine avec l'oxygène et d'autres non-métaux, et qui réagit avec des acides dilués en dégageant de l'hydrogène (Mahan, 1987).

L'état d'oxydation unique du zinc est +2 (appelé ion zincique), ainsi la géochimie du zinc est relativement peu complexe et l'on note un comportement chalcophile assez marqué par une association fréquente avec le soufre (S, Mahan, 1987). Les sources naturelles de zinc dans l'environnement sont l'altération de roches (56%), le volcanisme (22%) et la végétation (Lantzy et Mc Kenzie, 1979 ; Phelan et al., 1982 ; Horowitz, 1985). Cependant, Nriagu (1991

; 1996) a calculé que ces sources naturelles ne représentent qu'environ 7% des émissions totales de cet élément dans l'environnement, étant donné que la production et le traitement de minerai et les activités industrielles représenteraient 75% et 18% respectivement, des émissions du Zn dans le milieu naturel.

La principale utilisation du zinc est la galvanisation des aciers : le dépôt d'une mince couche de zinc en surface de l'acier le protège de la corrosion, Il est aussi utilisé en agriculture, comme apport d'oligo-élément, essentiellement en zone de sols fortement calcaires. (Anonyme, 2007) (Tableau VIII).

**Tableau VIII : Propriétés physicochimiques du Zinc. (Tiré de J.K. Barbalaceinc., 2012).**

Propriétés	Valeurs
Masse molaire	65.39 g/mol
Pression de vapeur	19.2 Pa à 419.73°C
Solubilité dans l'eau	Non soluble à 20°C
Etats d'oxydation	2(0 et +2)

### 3.4.5 Le Cuivre

Le cuivre est un élément chimique de symbole Cu et de numéro atomique 29. Métal de couleur rougeâtre, il possède une haute conductivité thermique et électrique à température ambiante, le seul métal pur ayant une meilleure conductivité électrique est l'argent (Hurlbut J.r. et Klein, 1982 ; Mahan, 1987). Sa couleur rougeâtre le diffère au même titre que l'or par la couleur généralement grise des métaux. Le cuivre est un des rares métaux qui existe à l'état natif. L'occurrence du cuivre natif est cependant assez faible (Hurlbut J.r. et Klein, 1982). Cu est moyennement abondant dans la croûte terrestre pour être un métal lourd (Wedepohl, 1995) ; on le trouve le plus fréquemment sous forme de sulfure ou de sulfosel (Hurlbut J.r. Et Klein, 1982). Le cuivre pourrait bien être le premier métal à avoir été utilisé, étant donné que des pièces datant de 8700 avant J.-C. ont été trouvées (Anonyme, 2007). Est un métal très employé dans les alliages, parmi lesquels le laiton (cuivre et zinc), le bronze (cuivre et étain), le maillechort (cuivre, zinc et nickel) et dans l'industrie électrique. Les sels de cuivre sont largement utilisés dans l'agriculture tant qu'insecticide, fongicide, algicide et dans l'industrie textile et photographique, la fabrication de pigments, les tanneries, les traitements de surface et la céramique. (H. Meftah El-Naas *et al*, 2010) (Tableau IX).

**Tableau IX** : Propriétés physicochimiques du Cuivre. (Tiré de J.K. Barbalaceinc., 2012).

Propriétés	Valeurs
Masse molaire	63.546 g/mol
Pression de vapeur	0.0505 Pa à 1085 °C
Solubilité dans l'eau	Non soluble à 20°C
Etats d'oxydation	5(0, +1, +2, +3 et +4)

### 3.4.6 Le Nickel

Le nickel est un élément chimique de symbole Ni et de numéro atomique 30. C'est un métal blanc, brillant et dur, présent en faible quantité dans la croûte terrestre, surtout sous forme de minerais sulfurés, oxydés et silicatés. Il est couramment utilisé pour fabriquer des alliages de métaux solides et durables (aluminium, cuivre et fer) (Lauwerys Robert ., 1992).

Il peut provenir d'une source naturelle qui représente 0.8 à 0.9% de la croûte terrestre. Il est présent dans divers minerais : la chalcopyrite, la pentlandite, la garniérite et secondairement la niccolite et la millerite. Comme il peut provenir des sources anthropiques comme la combustion de charbon ou de fuel, l'incinération des déchets, l'épandage des boues d'épuration, l'extraction et la production de nickel, la fabrication de l'acier, le nickelage et les fonderies de plomb. (M, Bisson., 2006.)

Il entre dans la production d'aciers inoxydables et d'autres aciers spéciaux, la présence de nickel dans ces produits améliorant leurs propriétés mécaniques et leur résistance à la corrosion et à la chaleur, ainsi que dans la préparation d'alliages non ferreux (avec le cuivre, le chrome, l'aluminium, le molybdène...), notamment pour la fabrication des pièces de monnaie, d'outils, d'ustensiles de cuisine et de ménage. (N. Bonnard *et al*, 2019) (Tableau X).

**Tableau X** : Propriétés physicochimiques du Nickel. **Crédit** : <https://www.universalis.fr/encyclopedie/nickel/2-proprietes/>

Propriétés	Valeurs
Masse molaire	58.6934 g/mol
Pression de vapeur	237 Pa à 1452.85 °C
Solubilité dans l'eau	Non soluble (0.2mg/l à un pH 7)
Etats d'oxydation	2,3

Tableau XI : classification périodique des éléments. (Fourest E, 1993).

Bloc s		Métaux lourds cités précédemment.										Bloc p						
H		Métaux lourds de densité > 5																He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne	
Na	Mg	Bloc d										Al	Si	P	S	Cl	Ar	
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Te	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	
Fr	Ra	Ac	Bloc f															
Lanthanides			Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu		
Transuraniens			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Cf	Bk	Es	Fm	Md	No	Lr		

### 3.5 Paramètres influençant la biodisponibilité des métaux lourds

La toxicité d'un métal dépend de sa spéciation (différents formes chimiques d'un élément métallique) autant que des facteurs environnementaux (BABICH, 1980). Dans le sol, les métaux lourds peuvent exister sous forme d'ion libre ou sous forme liée à des particules de sol. Cependant, un métal n'est toxique pour les organismes vivants que s'il est sous forme libre ; il est alors biodisponible (HUYNH, 2009).

La biodisponibilité en métaux lourds définit leur aptitude à être transférés d'un compartiment vers un autre. Plus l'espèce métallique est libre et mobile, plus elle est biodisponible et plus il ya un risque de toxicité sur les organismes vivants. En effet, les métaux lourds existent soit sous forme élémentaire soit sous forme dérivée. Etant chargés positivement, ils sont alors susceptibles d'interagir avec n'importe quels éléments chargés négativement pour former des dérivés inorganiques (sel, sulfure, oxyde) ou organiques (avec liaison carbone). (Maynaud, 2012).

Différents paramètres influencent la biodisponibilité des métaux dans les sols et donc leur toxicité. Parmi ces paramètres, le pH joue un rôle essentiel dans la solubilité des métaux. Ainsi, un pH acide entraîne une solubilisation des métaux, les rendant plus disponibles et donc potentiellement plus toxiques. La composition du sol est également impliquée. L'argile et la matière organique adsorbent les éléments et les séquestrent sous forme de complexes stables faiblement mobiles alors que les particules plus grossières comme le sable ou le gravier retiennent moins les métaux, augmentant leur biodisponibilité (HUYNH, 2009). De plus, l'augmentation de la température, que ce soit du point de vue chimique ou physiologique, a

pour effet d'intensifier l'action des substances toxiques, en facilitant le contact entre les microorganismes et les substances toxiques d'une part, et d'autre part en stimulant l'activité métabolique. Les microorganismes vont absorber ainsi, dans l'unité de temps, une plus forte quantité de substance toxique (**HABI, 2007**).

### 3.6 Effet des métaux lourds

#### 3.6.1 Sur le vivant

L'accumulation de petites doses dans le corps provoque à long terme des effets indésirables (**Ross et Kaye, 1994**). En général, les humains sont exposés ETMs par l'ingestion (Boisson ou nourriture), par inhalation (voie respiratoire) ou par voie cutanée (**Martin et Griswold, 2009 ; Qu et al., 2012**).

Cependant, quel que soit le mode de contamination, les éléments s'accumulent dans l'organisme (sang, foie, cerveau, reins, etc.) et ne sont éliminés que très lentement. Le tableau II montre, par ordre croissant, la demi-vie biologique des métaux (**SALLE, 1999**), au bout de laquelle l'organisme a éliminé la moitié de la quantité absorbée. Celle-ci s'étale de quelques jours pour le molybdène (Mo) à plusieurs années pour le Cr, le Zn ou le Cd. On note que certains éléments (Pb, Hg, Cd) ont des demi-vies biologiques très différentes selon leur cible dans l'organisme. D'une manière générale, Il est important de noter que le temps de demi-vie biologique des métaux est fonction de la concentration du métal absorbée (**WEBB et al., 1997 ; SALLE, 1999**) (Tableau XII).

**Tableau XII : Temps de demi-vie biologique de quelques éléments (WEBB et al., 1997 ; SALLE, 1999)**

Elément	Temps de demi-vie biologique
Mo	5 jours
Pb	20-30 jours dans le sang 40-60 jours dans les reins, la moelle, le foie, le cerveau 2-10 ans dans les os
Hg	30-60 jours 1 an dans le cerveau
Cr	1-2 ans
Zn	2-3 ans
Cd	30 jours dans le sang 20-30 ans dans le rein

### 3.6.2 Sur les microorganismes

Les concepts de tolérance, résistance et sensibilité aux métaux peuvent être facilement confondus les uns avec les autres ou utilisés un peu à toutes les sauces. De plus, les définitions précises des termes tolérance et résistance portent parfois à confusion dans la littérature. Une publication de Gadd (1992) propose une terminologie plus précise et spécifique. Le terme «tolérance » devrait être employé lorsque les organismes supportent la présence des métaux grâce à leurs caractéristiques biologiques intrinsèques, alors que le mot « résistance » devrait être mentionné lorsque les organismes survivent à la présence de métaux à l'aide de mécanismes de détoxification spécifiques induits en présence du contaminant **(Pier-Anne, 2009)**.

De manière globale, les métaux exercent une pression sélective augmentant la tolérance de base de certains microorganismes, mais diminuent la biodiversité des microorganismes retrouvés dans ces sols en comparaison avec des sols non pollués **(Pier-Anne, 2009)**

La sensibilité des microorganismes peut se traduire par une diminution de l'expression protéique alors qu'une augmentation de l'expression protéique signifierait une tentative d'adaptation au nouveau contaminant (expression d'un mécanisme de résistance) **(Pier-Anne, 2009)**. Chez les bactéries, les gènes codant pour l'expression des protéines impliquées dans ces mécanismes sont principalement plasmidiques, bien que quelques-uns soient chromosomiques **(Pier-Anne, 2009)**. L'origine plasmidique de certains gènes peut résulter en une fréquence de transfert plus élevée de ces plasmides en conditions de stress. Un tel exemple a été démontré chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* qui, en présence de métaux, transférait ses plasmides lui procurant sa résistance **(Pier-Anne, 2009)**.



***Matériel et  
méthodes***

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire VALCORE de l'université de Boumerdes et le laboratoire de l'environnement du centre de recherche et de développement (CRD) durant une période de 3 mois (un jour par semaine). Il a pour objectif l'analyse physicochimique des échantillons d'eaux de sebkha prélevées et l'étude de l'effet du Mercure sur la croissance cellulaire des souches halophiles isolées à partir de ces échantillons.

## **4 Matériel et méthodes**

### **4.1 Matériels**

#### **4.1.1 Matériels non biologiques**

Les équipements, les verreries, matériels en plastique, les réactifs et les modes opératoires utilisés pour la réalisation de notre travail sont cités dans **l'annexe n° 01**.

#### **4.1.2 Matériels biologiques**

Les souches bactériennes utilisées durant cette étude sont des souches halophiles extrêmes isolées à partir de sebkhas algériennes par l'unité de recherche « Biodiversité microbienne et biotechnologies des Ecosystèmes Aquatiques salins et pétroliers (BMBEAP) au sein de laboratoire conversion et valorisation des ressources biologiques de la faculté des sciences.

Elles ont été identifiées comme étant des souches halophiles. La conservation de ces souches a été faite à 4°C dans un milieu liquide spécifique SH standard, additionné de 25% de NaCl (**Khemili et al., 2015**).

#### **4.1.3 Milieux de culture**

Un seul milieu de culture a été utilisé dans ce travail :

- **Le milieu spécifique SH standard (Dworkin et al., 2006)** : utilisé pour la revivification des souches halophiles extrêmes. Ce milieu présente une forte salinité et l'amidon à raison de 2g/l comme source de carbone. La composition de milieu SH standard est donnée dans **l'annexe n°12**.

## **4.2 Méthodes**

### **4.2.1 Sites d'étude et échantillonnage**

Les analyses physicochimiques de l'eau ont été effectuées sur quatre points espacés le long de chaque sebkha, en surface et à une profondeur de 20cm, les échantillons 1,2 et 7 sont des trois prélèvements de sebkha d'**Oum El Bouaghi**, et l'échantillon 6 de **Biskra**.

#### **4.2.2 Prélèvement des échantillons**

L'échantillonnage a été effectué le mois de Mars 2021. Les prélèvements des différents échantillons d'eau ont été prélevés de façon aseptique dans des flacons de 1 L en plastique stérile. Le transport des échantillons est réalisé par voie routière dans des glacières réfrigérée (4°C) jusqu'au laboratoire pour les l'analyses physico-chimiques.

#### **4.2.3 Analyse physicochimique des échantillons de l'eau**

Afin d'avoir un aperçu sur la composition physico-chimique des échantillons d'eaux de sebkha prélevés ainsi que leurs salinité, une analyse a été réalisée selon les méthodes préconisées par **Rodier (1996)**.

Les analyses effectuées au niveau CRD ont porté sur les paramètres suivants :

- Paramètres organoleptiques (couleur, gout, odeur).
- Paramètres physiques (pH, turbidité, conductivité et température).
- Paramètres chimiques (les sels dissous :  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $HCO_3^-$ , et la salinité).

Les analyses physico-chimiques des échantillons d'eau physico-chimiques des échantillons d'eau des sulfates ( $SO_4^{2-}$ ) sont déterminées par dosage colorimétrique à l'aide d'un spectrophotomètre (UV/visible). Le calcium ( $Ca^{2+}$ ) et le magnésium ( $Mg^{2+}$ ) sont dosés par la méthode volumétrique en EDTA. Les bicarbonates ( $HCO_3^-$ ) sont analysés par dosage volumétrique avec du HCl 0,05 N. Les chlorures sont dosés par le nitrate d'argent en présence de bichromate de potassium ; la salinité qui est la teneur en sel dissous dans l'eau, est exprimée à partir de la chlorinité

#### **✚ Méthodes opératoires d'analyses physico-chimiques des échantillons d'eau (matériels, les verreries, les réactifs)**

##### **4.2.3.1 Les paramètres organoleptiques**

Les paramètres organoleptiques comprennent : L'odeur et gout et le couleur.

- **Odeur et goût** : sont des aspects qualitatifs dont les sens sont les seuls juges : le nez est apte à identifier l'odeur, et la langue pour identifier le goût.
- **Couleur** des échantillons d'eau se mesure par comparaison visuelle avec d'un autre échantillon de l'eau incolore en utilisant l'échelle de couleurs à l'aide d'un colorimètre aqua quant comparateur.

#### 4.2.3.2 Paramètres physiques

##### 4.2.3.2.1 Mesure de la Température (méthode d'électrochimique)

La température de l'eau permet de corriger les paramètres d'analyse dont les valeurs sont liées à la température (conductivité notamment). Les appareils de mesure de la conductivité ou du pH possèdent généralement un thermomètre intégré (**Laboratoire d'environnement CRD**).

##### 4.2.3.2.2 Mesure du pH

Le pH (potentiel Hydrogène) est la mesure de la concentration en ions H<sup>+</sup> de l'eau. Il traduit ainsi la balance entre acide et base sur une échelle de 0 à 14 (**Rodier et al., 1996**).

###### Principe

La différence de potentiel existant entre une électrode en verre et une électrode de référence (calomel- KCl saturé) plongeant dans une même solution est une fonction linéaire du pH de cette solution. La détermination consiste en la mesure d'une différence de potentiel, cette dernière est liée à l'activité des ions H<sup>+</sup> (**Laboratoire d'environnement CRD**).

L'appareillage et le mode opératoire sont mentionnés dans **l'annexe n°02**.

##### 4.2.3.2.3 Mesure de la turbidité (méthode Néphélométrique)

###### Principe

La mesure de la turbidité permet de préciser les informations visuelles sur l'eau. La turbidité traduit la présence de particules en suspension dans l'eau finement divisées. L'appréciation de l'abondance de ces matières mesure son degré de turbidité. Elle est mesurée à l'aide d'un turbidimètre, le faisceau lumineux traverse horizontalement la cuvette contenant l'échantillon, une partie de cette lumière est diffusée par effet Tyndall grâce aux particules en suspension (**Laboratoire d'environnement CRD**).

Le mode opératoire est mentionné dans **l'annexe n°03**.

##### 4.2.3.2.4 Mesure de la conductivité

###### Principe

La conductivité mesure la capacité de l'eau à conduire le courant entre deux électrodes métalliques de 1 cm<sup>2</sup> de surface et séparées l'une de l'autre de 1 cm. L'unité de conductivité est le micro-siemens par centimètre (μS/cm). La conductivité traduit la minéralisation totale de l'eau, la plupart des matières dissoutes dans l'eau se trouvent sous forme d'ions chargés électriquement. La mesure de la conductivité permet donc d'apprécier la quantité de sels dissous

dans l'eau. Elle est également en fonction de la température de l'eau : elle est plus importante lorsque la température augmente. Les résultats de mesure doivent donc être présentés en termes de conductivité équivalente à 20 ou 25°C (**Laboratoire d'environnement CRD**).

Le mode opératoire est mentionné dans **l'annexe n°04**.

#### **4.2.3.3 Paramètres chimiques**

Une analyse chimique des eaux est effectuée pour déterminer la concentration des différents éléments chimique présents (détermination de la concentration des sels dessous).

##### **❖ Préparation d'une dilution**

L'appareillage et le mode opératoire sont mentionnés dans **l'annexe n°05**.

##### **4.2.3.3.1 Dosage du Calcium par complexométrie**

###### **✚ Principe**

Il consiste en la complexation des ions de calcium par l'acide éthylènediamine tetraacétique en présence d'un indicateur coloré et dans une zone de pH comprise entre 12 et 13 (**Laboratoire d'environnement CRD**).

L'appareillage et le mode opératoire sont mentionnés dans **l'annexe n°06**.

La concentration du calcium est donnée par la formule

$$[\text{Ca}^{2+}] = V_A \cdot N \cdot D \cdot 40,08 \cdot 10^3 / \text{PE}$$

$V_A$  = Volume d'EDTA versé en ml.

$N$  = Normalité de la solution d'EDTA.

40,08.1000 : masse molaire du calcium en mg.

$\text{PE}$  = Prise d'essai en ml.

##### **4.2.3.3.2 Dosage du Magnésium par compléxométrie**

###### **✚ Principe**

Il consiste en la complexation du magnésium à pH = 10 en présence d'un indicateur coloré : le noir erichrome (**Laboratoire d'environnement CRD**).

L'appareillage et le mode opératoire sont mentionnés dans **l'annexe n°07**.

La concentration du magnésium est donnée par la formule suivante :

$$[\text{Mg}^{2+}] = 10^3 (V_B - V_A) \cdot N \cdot D \cdot 23,32 / \text{PE}$$

$V_A$  = Volume en ml nécessaire au titrage du calcium et du magnésium.

$V_B$  = Volume en ml nécessaire au titrage du calcium.

$N$  = Normalité de la solution d'EDTA.

$\text{PE}$  = Prise d'essai de l'eau à analyser.

24,32.1000 : masse molaire du magnésium en mg.

#### 4.2.3.3 Dosage des Chlorures par volumétrie

##### Principe

Il consiste à doser les ions chlorures combinés à l'état de chlorure d'argent ( $\text{AgCl}$ ) par le nitrate d'argent ( $\text{AgNO}_3$ ), ceci en présence d'un indicateur coloré : le chromate de potassium ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ) (**Laboratoire d'environnement CRD**).

L'appareillage et le mode opératoire sont mentionnés dans **l'annexe n°08**.

La concentration est obtenue par la formule suivante :

$$[\text{Chlorure}] = 10^3 \cdot V \cdot N \cdot D \cdot 35,457$$

$V$  = Volume en ml de  $\text{AgNO}_3$  nécessaire à la titration.

$N$  = Normalité de la solution de  $\text{AgNO}_3$ .

$35,457 \cdot 10^3$  = Masse atomique du chlore en mg.

$\text{PE}$  = Prise d'essai de l'eau à analyser en ml.

#### 4.2.3.4 Dosage des Carbonates et des bicarbonates par acidimétrie

##### Principe

La méthode consiste à déterminer le volume d'acide nécessaire pour neutraliser à  $\text{pH}=8.3$ , puis à  $\text{pH}=4.3$  l'eau à analyser. Alors, le volume d'acide nécessaire au titrage à  $\text{pH}=4.3$  correspond à la concentration en ions bicarbonates  $\text{HCO}_3^-$ . (**Laboratoire d'environnement CRD**).

L'appareillage et le mode opératoire sont mentionnés dans **l'annexe n°09**.

Les concentrations en carbonates et bicarbonates exprimées en mg/l sont données par les formules suivantes :

$$[\text{HCO}_3^-] = V \cdot N \cdot 61 \cdot 10^3 / \text{PE}$$

$$[\text{CO}_3^{2-}] = V \cdot N \cdot 60 \cdot 10^3 / \text{PE}$$

N= Normalité de la solution d'acide.

$60 \cdot 10^3$  = Masse en mg de  $\text{CO}_3^{2-}$ .

$60 \cdot 10^3$  = Masse en mg de  $\text{HCO}_3^-$ .

V = Volume d'acide en ml nécessaire à la neutralisation à pH=8.3.

V' = Volume d'acide en ml nécessaire à la neutralisation à pH=4.3.

PE = Volume de la prise d'essai en ml.

#### **4.2.3.3.5 Dosage des Sulfates**

L'appareillage et le mode opératoire sont mentionnés dans **l'annexe n°10**.

La valeur de sulfate sera affichée par Spectrophotomètre DR 1900.

#### **4.2.3.3.6 Mesure de la salinité**

La salinité est la teneur de sel dissous dans l'eau (Rodier, 1996). Elle est mesurée par un salinomètre à électrode (méthode électrochimique). On peut l'exprimer aussi à partir de la chlorinité (**Rodier, 1996**).

$$S\% = 0.030 + 1.8050 \text{ Cl}\% \text{ Ou } S = 1,648 [\text{Cl}^-]$$

#### **4.2.4 Analyse bactériologique des eaux**

Cette partie n'a peut-être été réalisée à cause de la crise sanitaire Covid-19 qui a mis à mal les conditions d'accès au sein du laboratoire de centre de recherche et de Développement de Sonatrach (C.R.D) à cause **des conditions sanitaires** à respecter (une fois par semaine). A cet effet, on s'est contenté d'utiliser des souches déjà isolées par l'unité de recherche BMBEAP au sein du laboratoire Conservation et Valorisation des Ressources Biologiques de la faculté des sciences pour le reste de nos travaux.

#### **4.2.5 L'étude de l'effet du mercure sur la croissance des souches halophiles**

Cette étude a été réalisée au sein de Laboratoire Valorisation et Conservation des Ressources Biologique (VALCORE) au niveau de la faculté des sciences M'HAMMED BOUGARA-BOUMERDES.

##### **4.2.5.1 Matériel**

Le matériel et les réactifs utilisés pour la réalisation de notre travail sont cités dans **l'annexe n°11**.

##### **4.2.5.1.1 Les souches bactériennes**

Sept souches halophiles et/ou halophiles extrêmes ont été utilisées pour notre étude (S1, S2, S3, S4, S5, S6 et S7). Elles ont été isolées à partir de différentes sebkha algériennes. La conservation de ces souches a été faite à 4°C dans un milieu liquide spécifique SH standard à 15% de NaCl.

##### **4.2.5.1.2 Milieux de cultures**

Le choix d'un milieu de culture dépend des espèces à cultiver et l'objectif de l'étude à réaliser. Pour cela nous avons utilisé le milieu SH standard (liquide et solide), qui est un milieu homogène composé principalement de Chlorure de sodium (NaCl) ajusté à pH7 (**figure 6**). C'est un milieu favorable pour la croissance des souches halophiles (**Dworkin et al., 2006**). La composition du milieu SH liquide est mentionnée dans **l'annexe n°12**.



**Figure 6** : Solution milieu SH liquide standard.  
(Photographie original)

##### **4.2.5.2 Méthodes**

##### **4.2.5.2.1 Préparation du milieu SH standard**

Tous les composants du milieu indiqués dans **l'annexe n°12**, sauf le chlorure de sodium, sont mélangés dans un Erlenmeyer de 1000 ml rempli d'eau distillée sous une agitation magnétique. Après homogénéisation de ces constituants le pH est ajusté entre 7 et 7,5 par l'ajout NaOH et HCl avant la stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20 min. Le chlorure de sodium est

stérilisé à part dans un Erlenmeyer de 100 ml pour éviter la précipitation des autres constituants du milieu pendant l'autoclavage, puis rajouté aseptiquement aux autres éléments avant l'utilisation.

#### **4.2.5.2.2 Revivification des souches**

Nous avons commencé par la revivification des souches halophiles conservées préalablement à 4°C. Cette étape a été effectuée près du bec benzène par l'ensemencement des souches dans des erlenmeyers de 50ml préalablement autoclavés contenant 15 ml du milieu SH liquide stérile ajusté à pH=7. Les erlenmeyers sont ensuite incubés dans un agitateur incubateur de 140 rpm à une température de 40°C pendant 5 à 7 jours.

#### **4.2.5.2.3 Vérification de la pureté des souches halophiles**

Par la suite, nous avons effectués une étude macroscopique et microscopique après une coloration de Gram et une observation à l'état frais pour la vérification de la pureté des souches bactériennes.

##### **4.2.5.2.3.1 Etude macroscopique**

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé de la durée et de la température de l'incubation, pour cela des cultures ont été réalisés sur des milieux SH solide dans des boites de pétri (**Annexe n°12**) afin de voir les différentes colonies, le piquage a été fait à partir des cultures liquides avec une incubation dans l'étuve à 40°C.

Les éléments de l'identification macroscopique sont :

**La taille :** diamètre des colonies (punctiformes, ou non punctiformes).

**La forme des colonies :** circulaire, ondulée, filamenteuse.

**L'opacité :** opaque, translucide ou transparente.

**L'aspect de surface :** lisse, rugueuse, brillante et dentelée.

**La consistance :** elle se juge au moment du prélèvement : visqueuse, sèche ou muqueuses.

**La couleur ou pigmentation :** couleur de colonies est celle de la gélose (pigments diffusable).

**Odeur :** Présence ou absence.

**L'élévation :** convexe, concave ou plate.

#### **4.2.5.2.3.2 Examen microscopique**

Grossissement linéaire = Grandissement de l'objectif X Grandissement de l'oculaire.

C'est une étape très importante pour l'identification des microorganismes (**Marchal et Bourdon, 1991**).

L'examen microscopique comprend :

- **L'examen à l'état frais** : c'est-à-dire les examens entre lame et lamelle de microorganismes vivants. (**Marchal et Bourdon, 1991**).
- **Les examens après coloration** : les colorations effectuées le plus souvent sur des frottis séchés et fixés, peuvent être classés en :
  - ✓ **Coloration usuelles** :
    - Coloration simple.
    - Coloration complexe type Gram.
  - ✓ **Coloration spéciales** : qui permet la mise en évidence :
    - Détails de la structure bactérienne : cils, spores..
    - Bactéries non colorables ou difficilement colorables par les techniques habituelles. (**Marchal et Bourdon, 1991**).

- **Observation microscopique à l'état frais**

- ✚ **Le principe**

Cette observation permet l'observation des bactéries vivantes en l'absence de toute fixation ou coloration, cette méthode permet d'observer : la morphologie des bactéries (cocci, bacille,...), le mode de groupement (isolés, chaînette, en amas,...) et la mobilité ou non des souches étudiées (**Singleton, 1999**).

Le matériel et le mode opératoire utilisés dans cette étude sont mentionnés dans **l'annexe 11**.

- ✚ **Observation**

L'observation de fait au microscope photonique à grossissement X 40 (**Singleton, 1999**). On additionne une goutte d'huile à immersion sur la lamelle lorsqu'on observe à l'objectif 100.

- **Coloration de Gram**

-  **Le principe**

C'est la coloration de base en bactériologie qui permet de distinguer les bactéries en Gram positif et en Gram négatif, cette distinction est fondamentale pour leur identification, cette coloration repose sur la perméabilité de la paroi bactérienne.

Le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques est après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes, le liquide de lugol (mordant) ajouté ensuite forme un complexe avec le violet de gentiane, dans le cas des bactéries à Gram négatifs, la perméabilité plus grande de la paroi permet à l'alcool d'éliminer ce complexe et donc ces bactéries fixent alors la fuchsine de ziehl et apparaissent colorées en rose.

Les bactéries à Gram positifs, dont la perméabilité de la paroi est moins importante, ne sont pas décolorées par l'alcool et reste colorées en violet (**Calmette A., et al, 1948 ; Langeron M., 1942**).

Les matériels, les réactifs et le mode opératoires sont mentionnés dans l'**annexe 11**.

-  **Observation**

- Bactéries colorées en violet foncé, elles sont dites Gram positif.
- Bactéries colorées en rose ou rouge pâle, elles sont dites Gram négatif.

On note pour chaque type de bactéries : taille, forme et mode de groupement.

#### **4.2.5.2.4 Etude de l'effet du mercure (HgCl<sub>2</sub>) sur la croissance des souches halophiles**

Dans ce travail nous avons testé l'effet du mercure sous forme de sels solubles HgCl<sub>2</sub>, à différentes concentrations sur la croissance et sur la pigmentation des souches. Les étapes de l'expérience sont décrites ci-dessous :

##### **4.2.5.2.4.1 Préparation de la solution mère**

La solution mère de HgCl<sub>2</sub> a été préalablement préparée dans un erlenmeyer, contenant une quantité du métal mesuré (sous forme de sels métalliques) et complété avec de l'eau distillée jusqu'à un volume de 100 ml puis agitée pendant quelques minutes pour avoir une solution homogène. Les mesures sont mentionnées dans le tableau ci-dessous : (**Tableau XIII**).

**Tableau XIII:** Les mesures effectuées pour la préparation de la solution mère.

Le métal utilisé	Quantité du métal (g)	Quantité de l'eau distillée (ml)
Mercure (1g/l)	0,1	100

#### 4.2.5.2.4.2 Préparation des pré-cultures

Nous avons réalisé les pré-cultures dans des erlenmeyers de 100ml, contenant des volumes égales des souches halophiles, additionnées d'un volume de mercure, puis complétées avec du milieu SH liquide jusqu'à 100 ml (**Tableau XIV**).

Les pré-cultures ont été par la suite incubées dans un incubateur-agitateur à 40°C avec une agitation de 150 rpm pendant 16 jours pour avoir une bonne croissance cellulaire et apparition de la couleur rouge-orange caractéristique des halophiles.

**Tableau XIV:** concentration de métal testé dans les pré-cultures de la souche S1 à la souche S7.

Pré-cultures	1ppm HgCl <sub>2</sub>
Volume des souches de S1 à S7 (ml /l).	10
Volume de la solution mère du métal (ml)	0,1
Volume du milieu de culture SH liquide (ml)	89,9
Volume final des pré-cultures (ml)	100

#### 4.2.5.2.4.3 Préparation des cultures en présence du mercure

Après 16 jours d'incubations des cultures à différentes concentration de Mercure : 1, 2, 5, 10 ppm (**Popescu et Dumitru, 2014**), ont été préparées pour un volume final de culture de 100 ml inoculées à raison de 10 ml de la pré-culture. Les mesures effectuées pour la préparation des cultures sont mentionnées dans le **tableau XV**.

**Tableau XV** : les différentes mesures pour la préparation des cultures des souches S3, S5 et S7 en présence du métal testé (HgCl<sub>2</sub>).

Concentration du métal HgCl <sub>2</sub> (ppm)	1	2	5	10
Volume de la solution Mère du métal (ml)	0.1	0.2	0.5	1
Volume du milieu de culture SH liquide (ml)	89.9	89.8	89.5	89
Volume de la pré- culture (ml)	10	10	10	10

Le volume prélevé de la solution mère est calculé par la formule suivante :

C<sub>1</sub> : Concentration de la solution mère.

V<sub>1</sub> : Volume prélevé de la solution mère.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

C<sub>2</sub> : Concentration de mercure testé.

V<sub>2</sub> : Volume final de la culture.

Par ailleurs, des erlenmeyers contenant 90ml de milieu SH liquide inoculé par 10 ml des trois souches S1, S2 et S3 séparément ont été utilisés comme témoins (sans Mercure).

Les cultures et les témoins ont été ensuite incubés dans un agitateur incubateur à 150 rpm et à 40°C.

Après 16 jours d'incubation une mesure de la DO a été faite pour les sept pré-cultures (**annexe n°14**) et un choix à fait : seules trois souches seront retenues pour le suivie de la croissance cellulaire en présence des différentes concentrations de mercure.

#### **4.2.5.2.4.4 Suivie de la croissance cellulaire des souches (S3, S5 et S7) en présence du mercure**

Le suivi de la croissance bactérienne en présence du mercure est réalisé en mesurant la densité optique (DO) par un spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 600nm. Cette mesure est considérée comme un indicateur biologique direct de la croissance bactérienne et de la résistance au métal testé.

#### **Principe de la DO**

Le principe général de la méthode repose sur le fait qu'une suspension de cellules n'est pas parfaitement transparente : elle absorbe d'autant plus la lumière, que la concentration cellulaire y est importante, cette méthode d'analyse est intéressante car elle permet de travailler sur de faibles quantités de substances, de manière non destructrice vis-à-vis de l'échantillon. Elle s'applique à un très grand nombre de dosages (**Jean-Louis M ; Theirry L, 2001**).

#### **4.2.5.2.4.5 Centrifugation et récupération du surnageant**

Les cultures des trois souches en présence des différentes concentrations de mercure après une incubation de 10 jours ont été centrifugées afin de séparer les cellules du milieu. La centrifugation a été réalisée par une centrifugeuse en raison de 8000rpm pendant 10 min.

#### **4.2.5.2.4.6 Dosage du Mercure restant dans les surnageant des différentes cultures par la technique ICP-MS**

La concentration résiduelle du mercure est déterminé à partir du surnageant des cultures par une technique utilisée par le laboratoire de l'environnement au niveau du CRD.

Trois témoins (sans souches) ont été fait avec des concentrations de 1, 2 et 5ppm de mercure afin de prouver le rôle des souches halophiles.

#### **Principe de la technique**

Dans le cadre d'études des sites pollués ou potentiellement pollués, les huit métaux lourds (arsenic, cadmium, chrome, cuivre, nickel, plomb, zinc et mercure) font l'objet d'une attention particulière (**base de données BASOL**). Ils sont quasi-systématiquement demandés en analyse. Mais, dans les laboratoires d'environnement, la mesure de ces métaux se fait en général par deux techniques différentes. D'un côté le mercure est analysé par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) ou par spectrométrie de fluorescence atomique (SFA) après un traitement spécifique (réduction et vapeurs froides par exemple) (**NF ISO 16772**). D'un autre côté, les sept autres métaux sont analysés par SAA ou par spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES). L'utilisation de l'ICP-MS dans ce type d'études permet d'envisager le dosage de tous ces métaux lors de la même analyse (**NF EN ISO 11885**).

A decorative horizontal scroll graphic with a light gray gradient and a blue outline. The scroll is partially unrolled at both ends, with the top edge curving upwards. The text is centered within the scroll.

## *Résultats et discussion*

## 5 Résultats et discussion

### 5.1 Analyses physico-chimiques

#### 5.1.1 Paramètres organoleptiques

Le tableau **XVI** présente les résultats des paramètres organoleptiques (couleur, odeur et goût).

**Tableau XVI : Résultats des paramètres organoleptiques.**

<b>Echantillons</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>Couleur</b>	Incolore	Incolore	Incolore	Incolore
<b>Goût</b>	Salé	Salé	Salé	Salé
<b>Odeur</b>	Absente	Absente	Absente	Absente

La couleur des quatre échantillons (1, 2,6 et 7) est d'apparence limpide et ne présente aucune matière en suspension.

La saveur de ces eaux est salée, car ce sont des échantillons d'eau de sebka caractérisés par leur salinité.

Les quatre échantillons ne présentent aucune odeur particulière, cela indique que cette eau ne présente aucun signe de pollution visible à l'œil nu ou de la présence de matières organiques en décomposition (**Rodier, 1996**).

#### 5.1.2 Paramètres physiques

Les résultats des analyses physiques sont donnés dans le tableau **XVII**.

**Tableau XVII : Résultats des analyses physiques.**

<b>Paramètres physiques</b>	<b>pH</b>	<b>Conductivité</b> ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ )	<b>Turbidité</b> (NTU)	<b>Température</b> ( $^{\circ}\text{C}$ )
<b>Echantillon 1</b>	6.45	54800	2.50	22.9
<b>Echantillon 2</b>	6.65	67200	11.1	23.3
<b>Echantillon 6</b>	5.47	114600	1.91	23.4
<b>Echantillon 7</b>	5.81	107500	3.65	23.8

#### **5.1.2.1 pH**

D'après les résultats obtenus l'analyse du pH montre que l'échantillon 1, 2, 6 et 7 varie entre 5,47 et 6,65 en comparant ces résultats avec celle décrite par **Boutaiba et al ., 2011**. Nous avons remarqué que ces valeurs de pH rapprochent à la neutralité (légèrement acide) inférieur à celui d'Himalatt Algérie (pH 7,2) (**voir l'annexe n°18**).

#### **5.1.2.2 Température**

La température c'est révélée comprise entre 22,9- 23,8°C, cette température basse s'explique par un échantillonnage effectué au mois de Mars 2021.

#### **5.1.2.3 La conductivité**

La mesure de la conductivité permet d'apprécier la quantité des sels dissous dans l'eau (**Rejsek, 2002**), elle est reliée à la température de l'eau dont plus la température augmente la conductivité est plus importante.

Les résultats obtenus de la mesure de la conductivité dans les quatre échantillons (1, 2, 6 et 7) elles sont respectivement (54800µs/cm, 67200µs/cm, 114600µs/cm, 107500µs/cm), ces valeurs de conductivité trouvées, nous permettent de déduire qu'il y a une grande teneur en sel dissous dans les échantillons 6 et 7.

#### **5.1.2.4 La turbidité**

La turbidité est la mesure qui donne une indication sur la teneur de matière solide en suspension. Les résultats des échantillons 1, 6 et 7 présentent de basse valeurs de turbidité (2.50 NTU, 1.91 NTU et 3.65 NTU) ce qui explique une teneur minimale de matière en suspension cependant, l'échantillon 2 (11.1 NTU) présente une valeur de turbidité élevée qui indique la présence d'une grande teneur de matière solide dans l'eau analysée.

### **5.1.3 Paramètres chimiques**

#### **5.1.3.1 Sels minéraux dissous**

La croissance et le développement des microorganismes sont fonction d'une part de la composition du milieu et des conditions physico-chimiques et d'autres part des éléments nutritifs spécifiques présents (**Leclerc, 1995**).

Les résultats des analyses chimiques sont donnés dans le tableau suivant : (**Tableau XVIII**).

**Tableau XVIII : Résultats des analyses chimiques.**

<b>Paramètres chimiques</b>	<b>Ca<sup>2+</sup></b> (g/l)	<b>Mg<sup>2+</sup></b> (g/l)	<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b> (g/l)	<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> (x10 <sup>-3</sup> ) (g/l)	<b>CO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> (g/l)	<b>Cl<sup>-</sup></b> (g/l)	<b>Salinité</b> (g/l) [NaCl]
<b>Echantillon 1</b>	1.02	0.58	0.11	7.93	0	230.47	416.02
<b>Echantillon 2</b>	1.60	0.04	0.09	9.15	0	177.28	320.02
<b>Echantillon 6</b>	1.52	1.04	1.31	4.27	0	14.18	25.62
<b>Echantillon 7</b>	3.11	1.00	2.68	4.88	0	8.86	16.02

D'après les résultats obtenus après le dosage des sels minéraux des échantillons 1, 2, 6 et 7, on constate qu'il existe une forte concentration de Cl<sup>-</sup> dans les échantillons 1 et 2 comme le cas du Solar saltern Sfax (Tunisie) (261.09 g/l) et Lac Salée El Golea (Algérie) (198g/l) (**Trigui et al., 2011 ; Hacene et al., 2004**) par contre les échantillons 6 et 7 sont pauvres en Cl<sup>-</sup> similaire au cas de la Mer caspienne (5.33g/l) et l'océan atlantique (19.2g/l) (**Khallef, 2019**) (**voir l'annexe n°18**).

Les résultats nous montrent que les eaux des deux échantillons (1 et 2) possèdent une forte concentration en chlorure de sodium (NaCl) favorable pour la croissance des bactéries halophiles (**Oren et al., 2000**).

Les trois échantillons (1, 6 et 7) présentent une concentration moyenne de Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> par contre l'échantillon 2 présente une moyenne concentration en Ca<sup>2+</sup> et une faible concentration en Mg<sup>2+</sup>. En effet ces oligo-éléments jouent le rôle de cofacteur ou d'activateur enzymatique (**Degrement, 1989**).

En particulier les ions Mg<sup>2+</sup>, qui favorisent la prolifération de la flore halophile extrême, les ions Ca<sup>2+</sup> sont nécessaires au métabolisme bactérien (**Vreeland et Hochstein, 1993 ; Eisenberg et al., 1987**).

Concernant la concentration des ions sulfates (So<sub>4</sub><sup>2-</sup>) les valeurs des échantillons obtenues sont très faibles en les comparants aux résultats de Lac salé Sambhar SSL (Inde) (6.00g/l) (**Khallef, 2019**) (**Voir l'annexe n°18**). Le sulfate constitue la forme la plus oxydée du soufre. Il joue un rôle essentiel dans le cycle biologique, favorisant ainsi le développement de bactéries sulfatoréductrices (**Cordonier, 1995**).

D'autre part le titre alcalimétrique complet ( $\text{HCO}_3^-$ ) des quatre échantillons est très faible lorsqu'on le compare avec celui de la mer morte (0,26 g/l) (**Post, 1981**). Ces ions sont utilisés comme source de carbone par les bactéries autotrophes halophiles (**Sorensen et al., 2004**).

Par contre les ions de carbonates ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) ne sont pas été détectés lors de l'analyse.

#### **5.1.3.2 Salinité**

La salinité est la teneur des sels dissous dans l'eau. La salinité pour les 2 premiers échantillons (1et2), nous avons obtenus un taux très élevés (416.02g/l et 320.02g/l), les résultats sont proches à celle de Solar saltern sfax (Tunisie) (376.6g/l) (**Trigui et al., 2011**). Et pour les deux autres échantillons (6 et7) (25.62g/l et 16.02g/l) nous avons obtenus un taux très faibles, les résultats sont proches à celle d'Océan Atlantique (34.85g/l) et mer caspienne (12.8g/l), (**Khallef, 2019**) (**voir l'annexe n°18**).

### **5.2 Revivification des souches bactériennes**

Après 10 jours d'incubation des souches halophiles de S1 à S7 à une température de 40°C sous une agitation de 150 rpm, nous avons observés l'apparition d'un trouble dans toute les souches halophiles ce qui indique la présence d'une croissance favorable de ces souches sur le milieu de culture SH à 15% de NaCl.

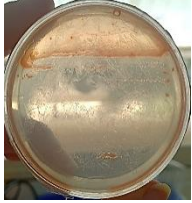


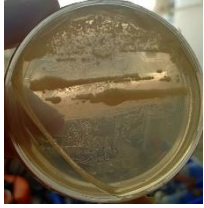
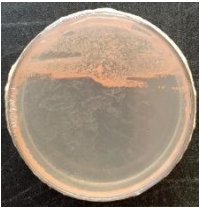
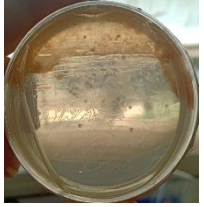
### **5.3 Vérification de la pureté des souches halophiles**


La vérification de la pureté par l'étude macroscopique des colonies et l'étude microscopique des cellules vivantes des souches halophiles étudiées est une étape très importante pour la suite de notre travail.

#### **5.3.1 Etude macroscopique**

Après 15 jours d'incubation des boites de Pétri dans l'étuve à 40°C, nous avons observé l'apparition des petites colonies dont certaines sont pigmentées, la description des colonies est mentionné dans le tableau ci-dessous (**Tableau XIX**).

**Tableau XIX :** Caractères macroscopiques des colonies des 7 souches halophiles après 15 jours d'incubation à 40°C sur milieu SH solide.

Caractères générales	La taille	La forme	L'aspect de la surface	L'opacité	La chromogène	La figure (Photographie original)
<b>Des colonies de la souche 1</b>	Petite colonie	Ronde bombée	Lisse	Opaque	Rouge-orange	
<b>Des colonies de la souche 2</b>	Petite colonie	Ronde bombée	Lisse	Translucide	Rouge-orange	
<b>Des colonies de la souche 3</b>	Petite colonie	Ronde bombée	Lisse	Opaque	Rouge-orange	
<b>Des colonies de la souche 4</b>	Petite colonie	Ronde bombée	Lisse	Opaque	Blanche	
<b>Des colonies de la souche 5</b>	Punctiforme	Ronde bombée	Lisse.	Opaque	Rouge-orange	
<b>Des colonies de la souche 6</b>	Punctiforme	Ronde bombée	Lisse	Translucide	Rose pale	

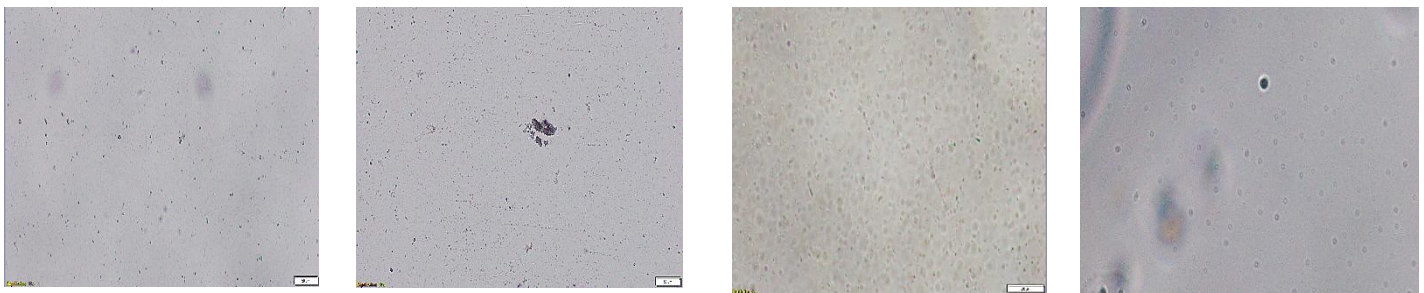
<b>Des colonies de la souche 7</b>	Punctiforme	Ronde bombée	Lisse	Translucide	Rose pale	
------------------------------------	-------------	--------------	-------	-------------	-----------	---

### 5.3.2 Etude microscopique

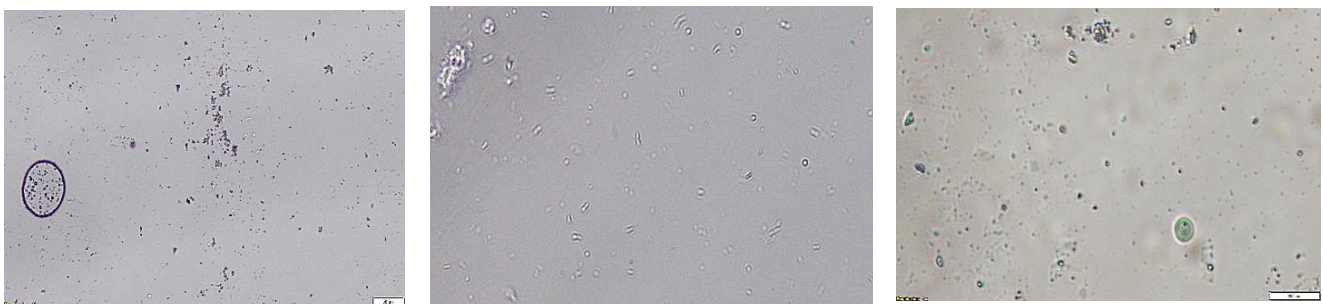
La pureté des souches halophiles étudiées a été vérifiée par une observation microscopique à l'état frais et par une observation après une coloration de Gram.

#### 5.3.2.1 Examen à l'état frais

L'observation à l'état frais des souches bactériennes a été effectuée au microscope photonique au grossissement (X10, X40) montre que les souches S3, S6 et S7 sont des cocci mobiles, pour les souches S1, S2, S4 et S5 des cocci immobiles.



<b>Souche 01</b>	<b>Souche 02</b>	<b>Souche 03</b>	<b>Souche 04</b>
------------------	------------------	------------------	------------------



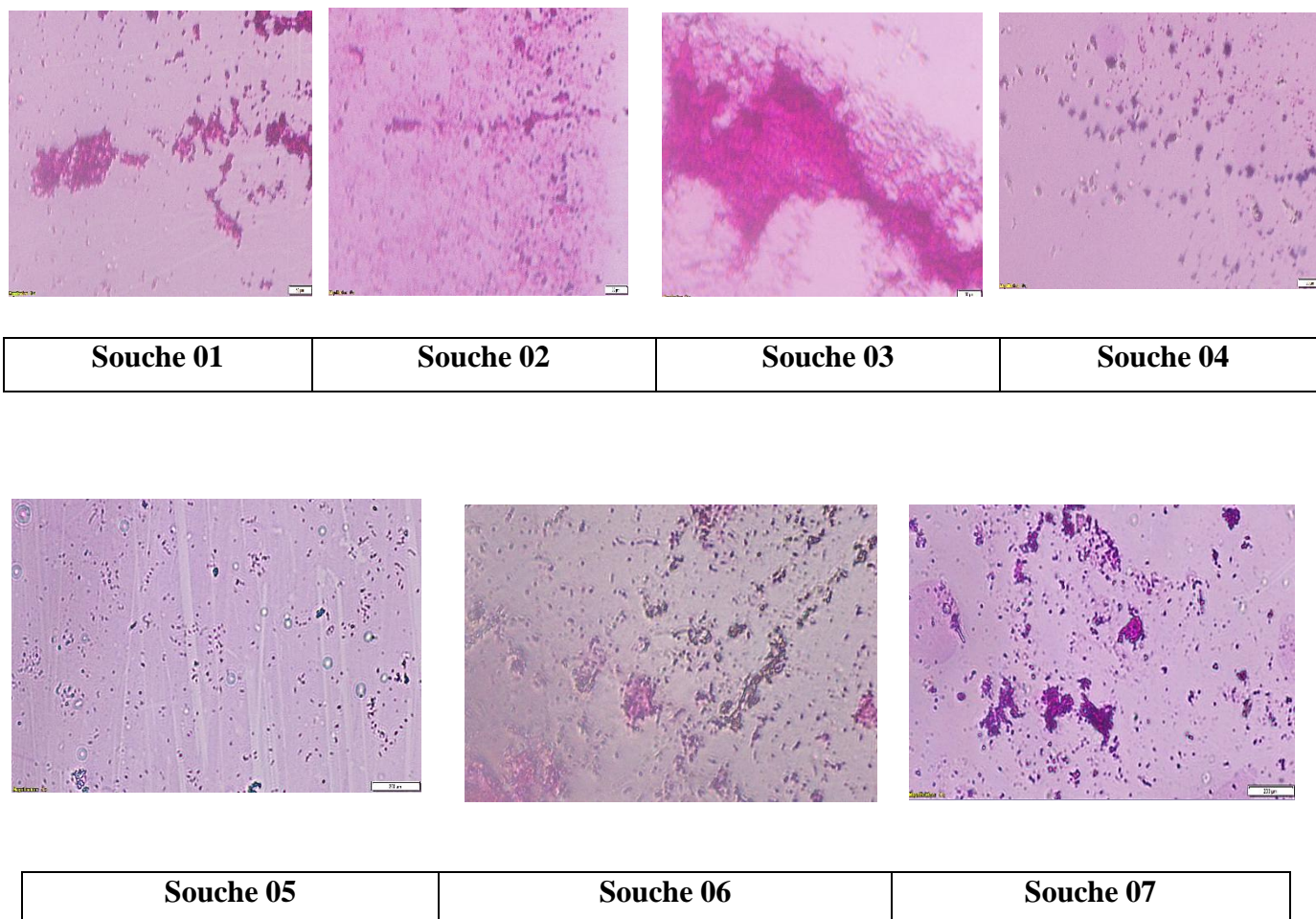
<b>Souche 05</b>	<b>Souche 06</b>	<b>Souche 07</b>
------------------	------------------	------------------

**Figure 7:** Aspect microscopique des souches halophiles (S1, S2, S3, S4, S5, S6 et S7) à l'état frais G X40. (Photographie original)

### 5.3.2.2 Examen après coloration de Gram

L'examen au microscope photonique à permet de bien apprécier le type de Gram de nos souches halophiles, leurs morphologies cellulaires et leurs mode de regroupement.

D'après les résultats obtenus après coloration, nous avons pu déterminer que les souches S1, S2 et S3 sont à Gram négatif (cellules colorées en rose), par contre les souches S4, S5, S6 et S7 sont à Gram positifs (cellules avec contour violet).



**Figure 8 :** Aspect microscopique des souches halophiles S1, S2, S3, S4, S5, S6 et 7 après coloration de Gram G X40. **(Photographie original)**

Les résultats de l'observation au microscope optique à l'état frais et la coloration de Gram sont présents dans le tableau suivant **(Tableau XX)**.

**Tableau XX :** Les résultats de l'observation au microscope optique à l'état frais et la coloration de Gram des 7 souches halophiles.

Aspect microscopique	Forme	Mobilité	Gram	Mode de regroupement
<b>Souche 01</b>	Cocci	Immobile	Négatif (-)	isolée, diploïde, regroupé en amas et en chaînette.
<b>Souche 02</b>	Cocci	Immobile	Négatif (-)	isolée, diploïde, regroupé en amas et en chaînette.
<b>Souche 03</b>	Cocci	Mobile	Négatif (-)	isolée, diploïde, regroupé en amas et en chaînette.
<b>Souche 04</b>	Cocci	Immobile	Positif (+)	isolée, diploïde, regroupé en amas et en chaînette.
<b>Souche 05</b>	Cocci	Immobile	Positif (+)	isolée, diploïde, regroupé en amas et en chaînette.
<b>Souche 06</b>	Cocci	Mobile	Positif (+)	isolée, diploïde, regroupé en amas et en chaînette.
<b>Souche 07</b>	Cocci	Mobile	Positif (+)	isolée, diploïde, regroupé en amas et en chaînette.

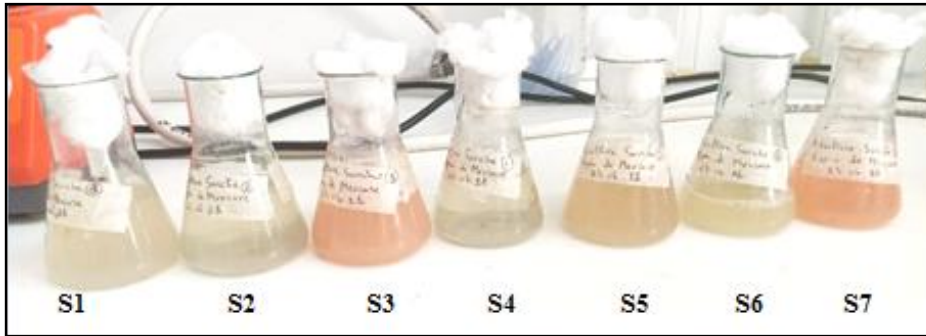
Les résultats obtenus des études macroscopique et microscopique des 7 souches halophiles confirment leurs puretés, état cellulaires cruciale pour ces souches afin de conduire à bien l'étude de l'effet du mercure sur leurs croissances.

#### **5.4 Effets du mercure sur la croissance des souches halophiles**

##### **5.4.1 Réalisation des pré-cultures en présence de 1ppm HgCl<sub>2</sub>**

Nous avons étudié l'effet du mercure sur 7 souches halophiles (S1, S2, S3, S4, S5, S6 et S7) et nous avons commencé par faire une étape de pré-culture dont laquelle les souches halophiles ont été incubé pour 16 jours en présence d'une concentration de 1ppm de HgCl<sub>2</sub>.

Les résultats obtenus sont présentés par la figure ci-dessous (**Figure 9**) où on constate que les souches halophiles S3, S5 et S7 ont pu pousser après 16 jours d'incubation à une concentration de 1ppm de mercure dans le milieu par l'apparition d'une pigmentation rouge-orange et pour cette raison on a sélectionné ses trois souches pour le suivi de notre étude sur l'effet de différentes concentrations du mercure.



**Figure 9** : Les pré-cultures des souches de S1 à S7 après 16 jours d'incubation dans un incubateur agitateur 40°C 150rpm. (Photographie original)

#### **5.4.2 Suivi de la fermentation en batch des souches S3, S5 et S7 en présence du mercure (HgCl<sub>2</sub>)**

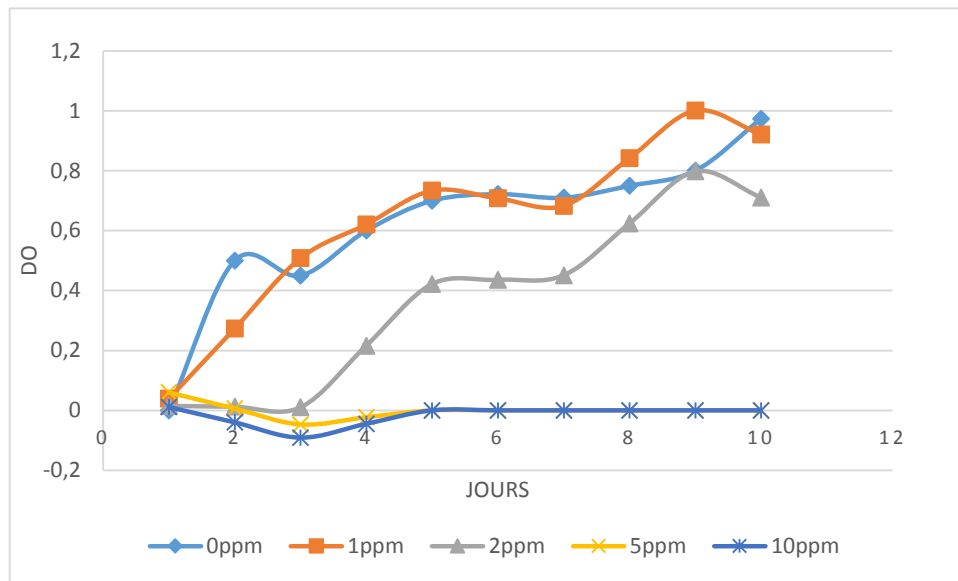
Après une phase des pré-cultures les souches ont été ensemencé sur des milieux contenant un milieu SH standard avec différentes concentration du mercure (1ppm, 2ppm, 5ppm et 10ppm) pour les souches qui ont été sélectionné (S3, S5 et S7).

Un suivi de la fermentation pendant 10 jours d'incubation dans un incubateur agitateur où des prélèvements journaliers ont été effectués ainsi que des mesures de la densité optique (DO) ont été prises par un spectrophotomètre a UV visible à 600nm pour suivre l'évolution de la croissance de ces souches et tracer des courbes.

A partir du 6<sup>ème</sup> jour d'incubation à 40°C sous une agitation à 150rpm, nous avons remarqué l'apparition d'un trouble accompagné d'une pigmentation rouge-orange dans les Erlenmyers contenant les pré-cultures de chaque souche et le métal testé, ce qui reflète la croissance cellulaire. Ce résultat montre que les souches ont toléré la présence du mercure dans leur milieu, la souche S3 a pu pousser à 1 et 2 ppm de mercure, la S5 à 1ppm de mercure et la S7 à 1, 2 et 5ppm de mercure. Les valeurs de la densité optique mesurées à 600nm sont données dans l'**annexe n°15** (pour la souche S3), l'**annexe n°16** (pour la souche S5) et l'**annexe n°17** (pour la souche S7).

Les résultats du suivi de la croissance des souches S3, S5 et S7 sont représentés dans les figures suivantes.

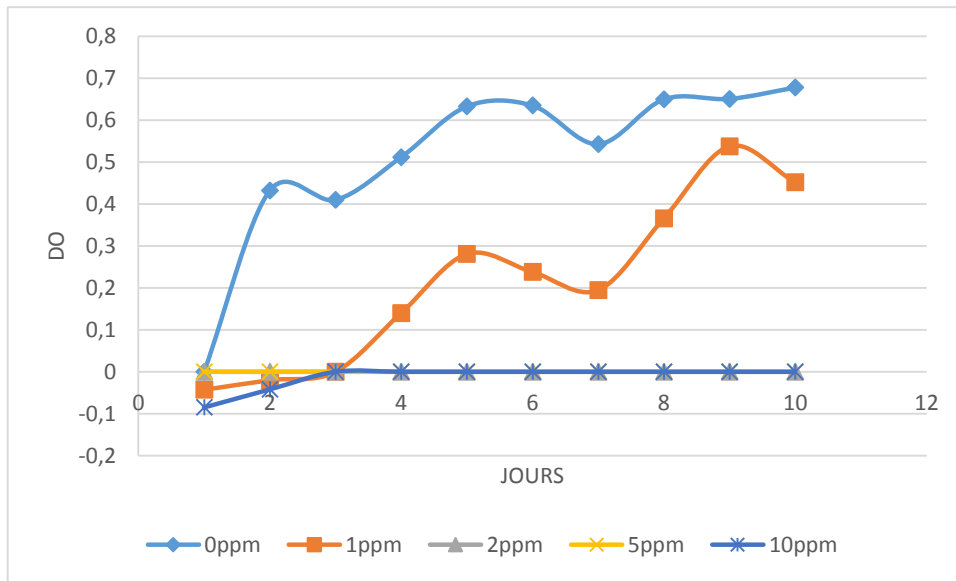
Suivi de la croissance de la souche S3



**Figure 10 :** Cinétique de croissance de la souche S3 sur milieu SH liquide à 15% de NaCl en présence des différentes concentrations de HgCl<sub>2</sub> à 40°C et à 150 rpm pendant 10 jours d’incubation.

L’analyse des courbes de croissances de la souche halophile S3 avec les concentrations de 1, 2, 5 et 10 ppm de HgCl<sub>2</sub> montrent que celles des deux premières concentrations (1ppm et 2 ppm) présentent les phases d’une courbe de croissance classique, à savoir : latence (qui dure 3 jours) pour la culture à 2ppm, exponentielle (de 3 à 9 jours) pour les cultures de 1 et 2ppm, stationnaire (à partir de 10 jours) pour les cultures de 1 et 2ppm. Notons que contrairement aux cultures en présence du mercure, la phase de latence n’a pas été marquée par cette souche en absence de ce métal (témoin à 0ppm). Cela montre la nécessité de cette souche halophile à s’adapter à des nouveaux éléments (tels le mercure) dans son milieu de culture même si cette dernière est déjà passée par une étape de pré-culture en présence de 1ppm de HgCl<sub>2</sub> pendant 16 jours d’incubation. D’après les résultats obtenus, nous remarquons que, même si c’est un peu faible par rapport au témoin (culture sans métal), la souche halophile S3 présente une bonne croissance cellulaire en présence des deux concentrations 1 et 2 ppm de HgCl<sub>2</sub> durant les 10 jours d’incubation à 40°C à 15% de NaCl. Cependant, aucune croissance n’a été observée en présence des concentrations 5ppm et 10 ppm de HgCl<sub>2</sub>. Ces résultats suggèrent qu’à ces concentrations, le mercure inhibe et a un effet toxique sur la croissance cellulaire de notre souche halophile S3.

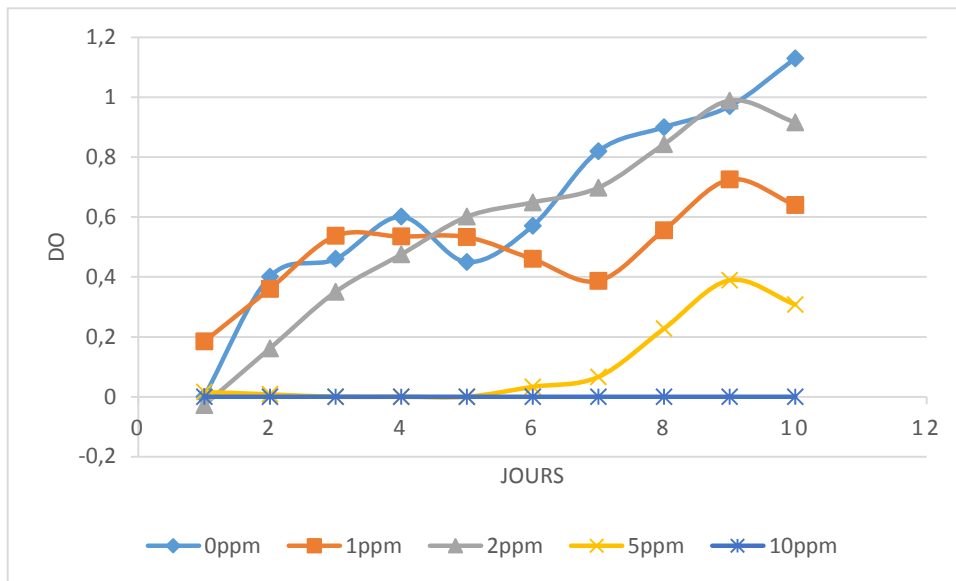
Suivi de la croissance de la souche S5



**Figure 11 :** Cinétique de croissance de la souche S5 sur milieu SH liquide à 15% de NaCl en présence des différentes concentrations de HgCl<sub>2</sub> à 40°C et à 150 rpm pendant 10 jours d’incubation.

L’analyse des courbes de croissances de la souche halophile S5 avec les concentrations de 1, 2, 5 et 10 ppm de HgCl<sub>2</sub> montrent que celles des de la première concentration (1ppm) présentent les phases d’une courbe de croissance classique, à savoir : latence (qui dure 3 jours), exponentielle (de 3 à 9 jours), stationnaire (à partir de 10 jours). Notons que contrairement aux cultures en présence du mercure, la phase de latence n’a pas été marquée par cette souche en absence de ce métal (témoin à 0ppm). Cela montre la nécessité de cette souche halophile à s’adapter à des nouveaux éléments (tels le mercure) dans son milieu de culture même si cette dernière est déjà passée par une étape de pré-culture en présence de 1ppm de HgCl<sub>2</sub> pendant 16 jours d’incubation. D’après les résultats obtenus, nous remarquons que, même si c’est un peu faible par rapport au témoin (culture sans métal), la souche halophile S5 présente une croissance cellulaire moyenne en présence de la concentration 1ppm de HgCl<sub>2</sub> durant les 10 jours d’incubation à 40°C à 15% de NaCl. Cependant, aucune croissance n’a été observée en présence des concentrations 2 ppm, 5ppm et 10 ppm de HgCl<sub>2</sub>. Ces résultats suggèrent qu’à ces concentrations, le mercure inhibe et a un effet toxique sur la croissance cellulaire de notre souche halophile S5.

Suivi de la croissance de la souche S7



**Figure 12 :** Cinétique de croissance de la souche S7 sur milieu SH liquide à 15% de NaCl en présence des différentes concentrations de HgCl<sub>2</sub> à 40°C et à 150 rpm pendant 10 jours d’incubation.

L’analyse des courbes de croissances de la souche halophile S7 avec les concentrations de 1, 2, 5 et 10 ppm de HgCl<sub>2</sub> montrent que celles des deux premières concentrations (1 ppm et 2 ppm) présentent les phases d’une courbe de croissance classique, à savoir : exponentielle (de 0 à 9 jours), stationnaire (à partir de 10 jours). Notons que contrairement aux cultures des souches précédentes, la souche S7 n’a pas marqué de phase de latence à des concentrations de 1 et 2 ppm de HgCl<sub>2</sub>. La culture sans métal ne présente pas de phase de latence aussi. Ceci montre bien le rôle de la pré-culture dans l’adaptation du microorganisme au sel métallique dans son milieu.

D’après les résultats obtenus, nous remarquons que, la souche halophile S7 présente une bonne croissance cellulaire en présence des deux concentrations 1 et 2 ppm de HgCl<sub>2</sub> durant les 10 jours d’incubation à 40°C à 15% de NaCl par rapport au témoin à 0ppm.

A 5ppm de HgCl<sub>2</sub>, nous avons observé une phase de latence plus longue (qui dure 5jours) en comparant avec les autres cultures. Aussi la courbe de croissance est beaucoup faible par rapport au témoin avec un maximum de 0,4

Cependant, aucune croissance n’a été observée en présence de 10 ppm de HgCl<sub>2</sub>. Ce résultat suggère qu’à ces concentrations, le mercure inhibe et a un effet toxique sur la croissance cellulaire de notre souche halophile S7.

Compte tenu des caractéristiques et du potentiel biotechnologique des halophiles et/ou des halophiles extrêmes, plusieurs chercheurs se sont intéressés à étudier leur résistance vis à vis des métaux lourds. (Al-Mailem *et al.*, 2011), ont montré la résistance des archae halophiles *Halobacterium*, *Haloflex* and *Halococcus* au mercure à des concentrations allant de 20 à 200 ppm à forte salinité (1 et 4 M NaCl). (Williams *et al.*, 2014) ont montré que parmi les cinquante-six souches halobactériennes isolées, *Halobacterium saccharovorum*, *Hb. salinarium* et *Natronobacterium gregoryi* avaient montré une résistance maximale allant jusqu'à 0.01, 0.001 et 0.001 mM de zinc, d'arsenic et de cadmium, respectivement.

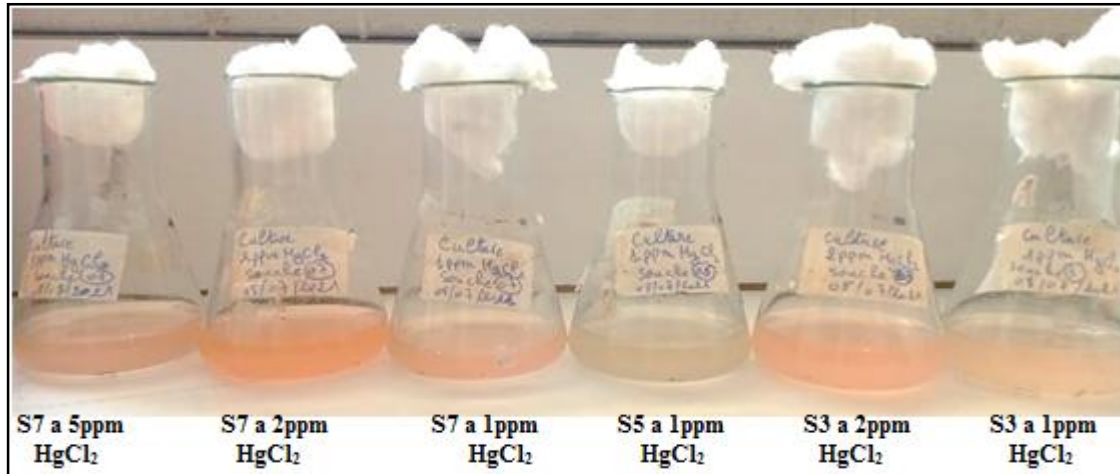
D'après nos résultats, nous avons pu mettre en évidence la résistance de nos souches halophiles aux différentes concentrations du mercure (HgCl<sub>2</sub>) dans un milieu SH à 15% de NaCl en présence de l'amidon comme source de carbone. La souche 07 a marqué une très bonne croissance cellulaire en présence de 1 et 2ppm de mercure par rapport au témoin et aux autres souches (S3 et S5). Une bonne croissance aussi a également été observée en présence de 1ppm et 2ppm de HgCl<sub>2</sub>.

#### **5.4.3 Observation de l'effet du mercure sur la production des pigments caroténoïdes**

Durant nos expériences nous avons constaté que la présence du Mercure (HgCl<sub>2</sub>) à différentes concentrations s'accompagne d'un changement de la pigmentation des cultures.

La modification de l'intensité de la pigmentation en variant la concentration du Mercure nous indique que le stress métallique peut affecter la production des pigments caroténoïdes.

La concentration du mercure HgCl<sub>2</sub> dans le milieu peut être un stress imposé aux bactéries qui peuvent changer leur production des pigments caroténoïdes selon les conditions de croissance. Cette production des pigments chez les *haloarchaea* est connue pour jouer un rôle protecteur dans le maintien de l'homéostasie cellulaire ainsi que dans la protection contre les dommages oxydatifs et autres stress (Khanafari *et al.*, 2010). Cette pigmentation rouge orange chez les *haloarchaea* est due aux caroténoïdes liés à la membrane et à la bactériorubérine C50 et à d'autres dérivés (Jehlicka *et al.*, 2013 ; Naziri *et al.*, 2014 ; Thombre *et al.*, 2016).



**Figure 13 :** Aspect des cultures des souches S3, S5 et S7 à différentes concentrations de HgCl<sub>2</sub> après 10 jours d'incubation. (Photographie original)

La diminution de l'intensité du pigment et le changement de couleur visible pourraient donc être dus à l'interférence de ces métaux avec la production de pigments, peut-être comme une réponse anti-stress, et/ou à la diminution de la croissance de notre souche en présence de concentrations élevées de ces métaux. En outre, (Naik et al., 2017) ont montré la capacité de l'archaea halophile extrême *Halobacterium sp.* SP1 à résister à 50  $\mu$ M de HgCl<sub>2</sub> et son potentiel de réduire le sélénite toxique et soluble en sélénium élémentaire moins toxique et insoluble (Se<sup>0</sup>). Cette réduction a été indiquée par le changement de la pigmentation de ses colonies du rouge à l'orange vif. Par ailleurs, les cellules bactériennes ont une charge nette négative, ce qui leur permet de maintenir fermement les ions sur leur surface cellulaire. Les études sur la résistance des métaux (le plomb et le cadmium) chez les bactéries halophiles réalisées par (Al-Momani et al., 2007) et (Massadah et al., 2005) ont indiqué que les métaux s'accumulaient sur la paroi cellulaire, la membrane plasmique ainsi que dans le cytoplasme. De plus, (Li et al., 2011) ont étudié la susceptibilité des bactéries Gram-positives (*Bacillus subtilis*) et Gram-négatives (*Pseudomonas putida* et *E. coli*) aux nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO) et ont découvert que les organismes à Gram-négatifs étaient les plus résistants.

#### 5.4.4 Bioaccumulation du mercure par les cellules bactériennes halophiles étudiées

A la fin de l'incubation des souches en présence des différentes concentrations de HgCl<sub>2</sub>, nous avons sélectionné les cultures qui ont montré une croissance cellulaire soit : la souche S3 (1 et 2 ppm) ; la souche S5 (1ppm) et la souche S7 (1, 2 et 5ppm). Ces cultures nous les avons centrifugés à 8000 rpm pendant 10 minutes pour séparer les cellules du milieu. Le surnageant

ainsi que les témoins sans souches à différentes concentrations de HgCl<sub>2</sub> (1, 2 et 5ppm) ont été disposés dans des tubes coniques pour être doser par la technique ICP-MS au CRD.

Les valeurs obtenues par l'analyse représentent les concentrations résiduelles du mercure dans le milieu, la concentration accumulée par les bactéries est calculée en ôtant la concentration résiduelle déterminée, de la concentration initiale utilisée.

Pour des raisons sanitaires qui nous dépassent, le dosage des solutions préparées n'a pas aboutis à sa fin et à notre regret nous n'avons pas les résultats pour les discuter.



***Conclusion et  
perspectives***

L'évolution de la technologie menée par l'être humain, a conduit à un appauvrissement des ressources naturelles de la terre, et par conséquent, à la perturbation des cycles biogéochimiques naturels. Le cadmium, le plomb et le mercure, sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, et ils sont devenus une préoccupation internationale, vu leurs toxicités sur l'Homme et l'environnement. C'est la raison pour laquelle, ces trois métaux et leurs effets néfastes sont de plus en plus étudiés de nos jours.

Les travaux présentés dans ce mémoire concernent l'étude de la résistance des microorganismes halophiles lors d'un stress induit au mercure.

L'analyse physicochimique des échantillons d'eau de sebkhas algériennes prélevés nous a permis d'avoir un aperçu sur leur composition en minéraux et notamment leurs taux de salinité. L'étape de pré-culture nous a permis de sélectionner trois souches résistantes à 1ppm de mercure sur les sept souches expérimentées.

Le résultat du suivi de la croissance cellulaire en présence des différentes concentrations de mercure montre que les souches étudiées (S3 et S7) ont marqué une croissance optimale en présence de 1ppm et 2ppm de  $HgCl_2$  alors que la souche S5 a marqué une croissance à 1ppm de mercure uniquement.

La modification de l'intensité de la pigmentation en variant la concentration du mercure nous indique que le stress métallique peut affecter la production des pigments caroténoïdes. Ces derniers jouent un rôle protecteur dans le maintien de l'homéostasie cellulaire ainsi que dans la protection contre les dommages oxydatifs et autres stress.

La croissance de ces microorganismes halophiles dans ces conditions extrêmes nous montre que ces dernières ont la capacité de développer des stratégies complexe (protéines spécifiques ou non spécifiques) pour s'adapter aux stress métalliques auxquels ils sont confrontés. Plusieurs de ces activités enzymatiques peuvent aujourd'hui trouver des applications en biotechnologie notamment en bioremédiation.

Notre étude a révélé la capacité des bactéries halophiles à s'adapter quel que soit le stress induit dans leur environnement, la tolérance des souches testées suggère que ces dernières peuvent être de bons candidats notamment en bioremédiation des milieux salins contaminés au mercure.

En perspectives, ce travail gagnerait à être approfondi par :

- La prolongation de l'étape de pré-culture pour une meilleure adaptation.
- Le dosage du mercure résiduel par ICP-MS dans le milieu pour évaluer la bioaccumulation du HgCl<sub>2</sub> par les souches.
- L'identification avec précision des souches bactérienne performantes.
- L'étude du profil protéique de ces isolats bactériens avec la technique du SDS PAGE en présence et en absence de ces métaux lourds serait d'un grand intérêt pour la révélation de l'effet de ces métaux lourds sur l'expression des protéines bactériennes.
- La détection et caractérisation des mécanismes impliqués dans la résistance aux métaux lourds par l'utilisation des techniques de biologie moléculaire.
- L'application de ces souches dans des sites pollués afin d'évaluer leur potentiel en bioremédiation.



***Références  
bibliographiques***



- Abbas S.H., Ismail I.M., Mostafa T.M., Sulaymon A.H. (2014).** Biosorption of heavy metals : A review.*J.Chem.Sci.Technol*, 3 :74-102.
- Alexander, M. (1997).** Microbial communities and interactions : à prelude. In *Manual of Environmental Microbiology*. Ed. C. I. Hurst. pp. 5-13. ASM Press, Washington.
- Alison, B. (2016).** Interactions microbiennes et adaptation en milieu extrême : peptides antimicrobiens d'archées halophiles, France, Ecole Doctorale Sciences de la nature et de l'Homme – ED 227, Thèse de Doctorat.
- Alkhedhairy A.A., Al-Rokyana and F.A. (2006).** Al-Misned: cadmium Toxicity and Stress Reponse. *Pak.J.Biol.sci*, 4: 1064-1094.
- Alloway B.J. (1995).** Heavy metals in soils. Edité par Alloway BJ. 2,"0 édition. Blakie Academic & Professional. London. Altsehn SF, Bognski MS, Gish W.
- Alloway B.J. et Ayres, D.C. (1997).** Chemical principals of Environmental Pollution. Blackie Academic and Profisional, an imprint of Chapman and Hall, London, 394pp.
- Al-Mailem D.M., Al-Awadhi H., Sorkhoh N.A., Eliyas M., Radwan S.S.(2011).** Mercury Resistance and Volatilization by Oil utilizing Haloarchaea Under Hypersaline Conditions. *Original Paper*, 15:39-44.
- Al-Momani F. A., Massedah A.M. and Hadady Y. A. (2007).** Uptake of Zinc and Copper by Halophilic Bacteria Isolated from the Dead Sea Shore, Jordan. *Biol Trace Elem Res*, 115 : 291-300.
- Anonyme. (2007).** Britannica Encyclopedia. Socied ad Comercial y Editorial santiago Ltda., Lima, 2800 pp.
- Anton, J., Oren, A., Benloch, S., Rodriguez-Valera, F., Amann, R., and Rossell ´o-Mora, R. (2002).** *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel extreme halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 485–491.
- Antunes A., Rainey F.A., Wanner G., Taborda M., Pätzold J., Nobre M.F., daCosta M.S., Huber R. (2009).** A new lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a brine-filled deep on the Red Sea. *J Bacteriol* 190:3580–3587
- Antunes A., Rayney F.A., Wanner G., Taborda M., Pätzold J., Nobre M.F., da Costa M., Huber R. (2008).** A new lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a brine-filled deep of the Red Sea. *J Bacteriol* 190: 3580–3587.
- Ayangbenro A.S., Babalola O. (2017).** A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. 19; 14(1):94.

**B**

**Babich H., Stotzky G. (1980).** Environmental factors that influence the toxicity of heavy metal and gaseous pollutants to microorganisms, 8(2):99-145.

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

**Base de données BASOL** sur les sites et sols pollués (ou potentiellement pollués). <http://basol.environnement.gouv.fr>.

**Beyth, M. (1980).** Recent evolution and present stage of Dead Sea brines. In *Hyper saline Brines and Evaporitic Environments*. Ed. A. Nissenbaum. pp. 155-165. Elsevier Amsterdam, the Netherlands.

**Boudjellal F, Hacene H. (1998).** Purification et caractérisation d'une halococine produite par une souche de Halococcus sp 250.. XIèmes journées de la société Algérienne de Microbiologie.. oran. Algérie.

**Bourel P-H & Berthelin J (1998).** Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion. Rapport n°42 de l'Académie des Sciences. 440 pages.

**Boutaiba, S., Hacène, H., Bidle, K.A. and Maupin-Furlow, J.A. (2011).** Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. *Arid Environments*.75 (10), 909-916.

**Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (1994).** *Biology of Microorganisms*, 7<sup>ème</sup> édition. p. 986. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA.

**Brown, A.D. (1976).** Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* 40, 803-846.

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

**C**

**Calmette A., Boquet A., Negre L. et Brettey J. (1948).** *Manuel technique de microbiologie et sérologie*, Masson & Cie, 4<sup>ème</sup> éd., p. 94-95.

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

**Chiffolleau, J.F., Claisse, I., Cossa, D., Ficht, A., Gonzalez, G., Guyo, T ; Michel, P., Miramand, P ; Oger, C., et Petit, F. (2001).** La contamination métallique, programme scientifique Seine aval ; 39p.

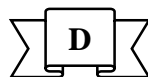
**Costenaro L. (2001).** Interactions faibles protéine–protéine en solution : La malate déshydrogénase halophile, Thèse préparée au Laboratoire de Biophysique Moléculaire Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (CEA–CNRS–UJF), Grenoble : 16.

**Csonka, L.N. (1989).** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53, 121-147.

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

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

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



**DasSarma, S., and DasSarma, P. (2012).** Halophiles. In eLS, (John Wiley & Sons, Ltd), p.

**D'Amico S, Collins T, Marx JC, Feller G, Gerday C. (2006).** Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO. Rep* ; 7: 385-389

**Dégremont. (1989).** Mémento technique de l'eau, Edition de cinquantenaire.

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

**Denger K., Warthmann R., Ludwig W., Schink B. (2002).** *Anaerophagathermo halophila* gen. nov., sp. nov., a moderately thermohalophilic, strictly anaerobic fermentative bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:173–178.

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

**Donachie S.P., Bowman J.P., Alam M. (2004).** *Psychroflexus tropicus* sp. nov., an obligately halophilic *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group bacterium from an Hawaiian hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 54 : 935–940.

**Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. (2006).** (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes.* Springer, New York, NY, pp. 69–81. doi : 10.1007/0-387-30743-5\_5.

E

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

**Ehrlich H. L. (2001).** Geomicrobiology of Mercury In: Geomicrobiology. 4ed. Marcel Dekker, Inc. New York • Basel. Pp 328-329.

F

**Fardeau ML, Gounant C, Dorléac N, Cayol JL and Ollivier B. (2005).** Isolation and phylogenetic characterization of anaerobic thermophiles originating from thermal springs in France. In Thermophiles 05 – From evolution to revolution. International Conference, Griffith University, Australia; 86.

**Fourest E. (1993).** Etude des mécanismes des biosorptions des métaux lourds par des Biomasses fongiques industrielles en vue d'un procédé d'épuration des effluents aqueux contaminés, Thèse de DOCTORAT de l'université Joseph Fourier- Grenoble, France.

**Franzmann P.D., Wehmeyer U., Stackebrandt E. (1988).** *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class *Proteobacteria* to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*. *SystApplMicrobiol*11:16–19.

G

**Galinski E.A. (1995).** Osmoadaptation in *bacteria*. *AdvMicrobPhysiol*37: 273– 328.

**García L. (2002).** La vie dans les milieux extrêmes. Texte de la 433ème conférence de L'Université de tous les savoirs : 1.

**Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T. (2005).** Phylum XIV *Proteobacteria* phyl nov. In: Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 2, 2nd edn, (The *Proteobacteria*), part B (The *Gammaproteobacteria*). *Springer, New York*: 1.

**Garrity G.M., Holt J.G. (2001).** Taxonomic outline of the *archaea* and *bacteria*. In: Boone D.R., Castenholz R.W (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1, 2nd edn, *The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria*. *Springer, New York*: Pp. 155–166.

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

**Ghassemi F., Jakeman A.J. and Nix H.A. (1995).** Salinisation of Land and Water Resources. (Eds.). Wallingford Oxon: CAB International.

**Grant, W. D. & Tindall, B. J. (1986).** The alkaline salt environment. In *Microbes in Exterme Environments*. Eds. R. A. Herbert & G. A. Codd. pp. 25-54. Academic Press, New York, USA.

**Grant W.D., Kamekura M., McGenity T.J., Ventosa A. (1998).** Class III. Halobacteria class nov. In : Boone D.R., Castenholz R.W., Garrit y 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.

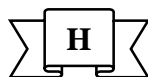
**Grant WD, Larsen H. Group111. (1989).** Extremely halophilic archaeobacteria. Order Halobacteriales ord. nov. In : Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG (eds), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 3., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, p. 2216-2218.

**Greenberg E.P., Canale-Parola E. (1976).** *Spirochaeta halophile* sp. nov. A facultative anaerobe from a high-salinity pond. *Arch Microbiol* 110: 185–194.

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

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

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



**HABI S. (2007).** Etude de la métallos-résistance et de l'halo-tolérance des entérobactéries isolées des eaux de surface de la région de Sétif, thèse de doctorat, Université "Ferhat ABBAS", Sétif, Algérie, 17-23.

**Hachicha M. (2007).** Les sols salés et leur mise en valeur en Tunisie. *Sécheresse* ; 18 (1) : 45-50. Halophiles, In: Horikoshi K. (ed.), *Extremophiles Handbook*, and Springer. P. 1248. Halophilic bacteria. *FEMS MicrobiolLett* 35:55-58. Halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Cabo de Gata, Almeria, southern Spain. *Int J SystEvolMicrobiol* 57 :1238-1242.

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

**HAMMI H. (2010).** La pollution des eaux par les métaux lourds, les IIIème Olympiades Tunisiennes de Chimie.

**Hartmann R., Sickinger H-D., Oesterhelt D. (1980).** Anaerobic growth of halobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3821–3825.

**H. Meftah El-Naas, Sulaiman Al-Zuhair, Aanal Abu Alhaija. (2010).** Removal of phenol from petroleum refinery Wastewater through adsorbition on date-pit activated carbon, chemical engineering journal. United. Arab. Emirates. 162. 997-1005.

**Hurlbut Jr., C.S. et Klein, C. (1982).** Manual de Mineralogía de Dana. Editorial Reverté, Barcelona, 564 pp.

**HUYNH T.M.D. (2009).** Impacts des métaux lourds sur l'interaction plante/ ver de terre/ microflore tellurique. Thèse de doctorat. Université Paris est, France, 7-10.

**Hobman JL., Crossman L. (2015).** Bacterial Antimicrobial Metal Ion Resistance. *J Med Microbiol*, 64:471-97.

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

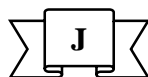
**Horowitz, A. (1985).** A primer on Trace Metal Sediment Chemistry, United States Geological Survey.



**Ingersoll, C.G., MacDonald, D.D., Wang, N., Crane, J.L., Field, L.J., Haverland, P.S., Kemble, N.E., Lindskoog, R. A., Severn, C. et Smorong, D.E., 200-** Prediction of sediment toxicity using consensus-based freshwater sediment quality guidelines, U.S.Environmental Protection Agency (USEPA). Chicago.

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

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



**Jakfar, Agustonodan Abdul Manan. (2014).** Deteksi Logam Timbal (Pb) Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Di Sepanjang Sungai Kalimas Surabaya. *Jurnal Saintek Perikanan*. 7(1): 56 – 62.

**Javor, B.J. (1983).** Planktonic standing crop and nutrients in a saltern ecosystem. *Limnol Oceanogr* 28, 153-159.

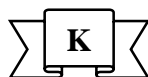
**Jean-Louis Meyzonnette et Thierry Lépine. (2001).** *Bases de radiométrie optique*, Cépaduès-Éditions.

**Jehlička J., Edwards H.G., Oren A. (2013).** Bacterioruberin and Salinixanthin Carotenoids of Extremely Halophilic Archaea and Bacteria : a Raman spectroscopic study. *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectrosc* ,106 : 99-103.

**J.K. Barbalace, inc. (2012).** EnvironmentalChemistry.com: Environmental, Chemistry & Hazardous Materials News, Careers & Resources,

**J.M.Brignon, L.Malherbe, S.Soleille. (2005).** Les substances dangereuses prioritaires de la directive cadre sur l'eau. Fiches de données technico-économiques, Rapport final, INERIS DRC-MECO-. 2004-5952.

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



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

**Kennedy S.P., Ng W.V., Salzberg S.L., Hood L., DasSarma S. (2001).** Understanding the adaptation of *Halobacterium* species NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence. *Genome Res* 11: 1641-1650.

**Khallef, S. (2019).** *Etude de la flore bactérienne halophile cultivable des zones humides d'Ouargla* (Algérie) [phD Thesis]. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Thèse de doctorat.

**Khanafari A., Khavarinejad D., Mashinchain A. (2010).** Solar Salt Lake as Natural Environmental Source for Extraction Halophilic pigments. *Iranian journal of Microbiology*, 2(2) : 103-109.

**Khemili-Talbi S., Kebbouche-Gana S., Akmuoussi-Toumi S., Angar Y., Gana M. L. (2015).** Isolation of an extremely halophilic archaeon *Natrialba* sp. C21 able to degrade aromatic compounds and to produce stable biosurfactant at high salinity. *Extremophiles* 19:1109–1120. DOI 10.1007/s00792-015-0783-9

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

**Kunte H., Trüper H., and Stan-Lotter H. (2002).** Halophilic Microorganisms in Astrobiology « *The Quest for the Conditions of Life* », Berlin, Springer.



**Langeron M. (1942).** *Précis de microscopie*, Masson & Cie, 6<sup>ème</sup> éd., p.553-556.

**Lantzy, R.J. et Mc Kenzie, F.T. (1979).** Atmospheric trace metals: global cycles and assessment of man's impact. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 43: 511-523.

**Lanyi J.K. (1974).** Salt dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev* 38: 272-290.

**Larsen, H. (1980).** Ecology of hypersaline environments. In *hypersaline Brines and Avaporitic environments*. Ed. A. Nissenbaum. pp. 23-60. Elsevier Amsterdam, the Netherlands.

**Lauwers R. (1992).** Nickel, Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles, 3e Édition, Masson : p192-197

**Lewis GN. (1923).** Valence and the Structure of Molecules. The Chemical Catalogue Co., New York, USA.

**Li M., Pokhrel S., Jin X., Madler L., Damoiseaux R. et Hoek E.M.V. (2011).** Stability, Bioavailability, and Bacterial Toxicity of ZnO and Iron- Doped ZnO nanoparticles in Aquatic Media. *Environ Sci Technol*, 45:755-761.

**Lipovsky A., Nitzan Y., Gedanken A., Lubart R. (2011).** Antifungal Activity of ZnO nanoparticles-the Role of ROS mediated cell injury. *Nanotechnology*, 22:101-105.

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

**LOVLEY D.R., LLOYD J.R. (2000).** Microbes with a metal for bioremediation. *Nat. Biotechnol.*, 18: 600-601.

**Lucht, J.H. and Bremer, E. (1994).** Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 3-20.

**Luciene M. Coelho, Helen C. Rezende, Luciana M. Coelho, Priscila A.R. de Sousa, Danielle F.O. Melo and Nívia M.M. Coelho. (September 9th 2015).** Bioremediation of Polluted Waters Using Microorganisms, *Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil*, Naofumi Shiomi, IntechOpen, DOI : 10.5772/60770.

**Ludwig W., Klenk H.P. (2001).** Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In: Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M (edn) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1, 2nd edn. Springer, New York. Pp. 49-65.



**Madern D., Pfister C., Zaccari G. (1995).** Mutation at a single acidic amino acid enhances the halophilic behaviour of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* in physiological salts. *Eur J Biochem* 230 : 1088-1095.

**Madigan M, Martinko J. (2007).** *Brock Biologie des micro-organismes*. Pearson Éducation, France.

**Mahan, B.H. (1987).** Química. Curso Universitario. Fondo Educativo Interamericano S. A.

**Makhdoumi-Kakhki A., Amoozegar M.A., Ventosa A. (2012).** *Salinibacter iranicus* sp. nov. and *Salinibacter luteus* sp. nov., isolated from a salt lake, and emended descriptions of the genus *Salinibacter* and *Salinibacter ruber*. *IJSEM*: 1-26 (sous presse).

**Mancinelli R.L., Hochstein L.I. (1986).** The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 35:55–58.

**Martin, S. and Griswold, W. (2009).** Human Health Effects of Heavy Metals. Environmental Science and Technology Briefs from Citizens, 15, 1-6.

**Marchal N., Bourdon J.L. et Richard C. I. (1991).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Biologie appliquée, nouvelle édition, 509p

**Massadah A. M., Al-Momani F. A. and Haddad H.I. (2005).** Removal of Lead and Cadmium by Halophilic Bacteria Isolated from the Dead Sea Shore, Jordan. *Biological Trace Element Research*, 108 :259- 269.

**Maturrano, L., Santos, F., Rossello´-Mora, R., and Anton, J. (2006).** Microbial diversity in Maras salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(6), 3887– 3895.

**Maynaud G.(2012).** Adaptation aux métaux lourds de populations de rhizobia impliquées dans la phytostabilisation de déblais miniers : Identification des mécanismes d'adaptation au Zn et au Cd, et structuration des populations de rhizobia adaptées aux sites miniers. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier II.

**M Bisson. (27/07/2006).** NICKEL ET SES DÉRIVÉS. INERIS. Vol 71. N°1.

**Mesbah N. M., Couk G. M. and Weigel J. (2009).** The halophilic alkalithermophile *Natranaerobius thermophilus* adapts to multiples environmental extremes using a large repertoire of Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporters. *Molecular Microbiology*, 74(2), 270-281. *Microbiol Mol Biol Rev* 62 :504-544.

**Minegishi, H., Echigo, A., Nagaoka, S., Kamekura, M., Usami, R. (2010).** *Halarchaeum acidiphilum* gen. nov., sp. nov., a moderately acidophilic haloarchaeon isolated from commercial solar salt. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 2513-2516.

**Monteiro C.M., Castro P.M.L., Macata F.X. (2011).** Biosorption of Zinc Ions from Aqueous Solution by the Microalga *Scenedesmus obliquus*. *Environ Chem Lett* 9:169-176.

**Morozkina, E.V., Slutskaia, E.S., Fedorova, T.V., Tugay, T.I., Golubeva, L.I. and Koroleva, O.V. (2010).** Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46: 1-14.



**Naseem R.O., Tahir S.S. (2001).** Removal of pb (II) from aqueous/ acidic solution by using Bentonite as an adsorbent. *Water Res* 35(16): 3982-3986.

**Naziri D., Hamidi M., Hassanzadeh S., Tarhriz V., Maleki Z.B., Nazemyieh M.A and Hejazi M.S. (2014).** Analysis of carotenoid production by *Halorum sp.* TBZ126; an Extremely Halophilic Archeon from Urmia Lake. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4(1) : 61-67.

**N. Bonnard. (Juin 2019).** Nickel et ses oxydes. inrs. Vol 11. N°68.

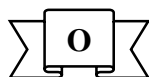
**Nedashkovskaya O.I., Kim S.B., Lysenko A.M., Frolova G.M., Mikhailov V.V., Bae K.S., Lee D.H., Kim I.S. (2005).** *Gramellaechinicola* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic bacterium of the family *Flavobacteriaceae* isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Int J SystEvolMicrobiol*55:391–394.

**NF EN ISO 11885 :** Qualité de l'eau - Dosage de 33 éléments par spectroscopie d'émission atomique avec plasma couple par induction. AFNOR.

**NF ISO 16772 :** Qualité du sol - Dosage du mercure dans les extraits de sol à l'eau régale par spectrométrie d'absorption atomique à vapeur froide ou par spectrométrie de fluorescence atomique à vapeur froide. AFNOR.

**Nieboer G &Richardson DHS. (1980).**The replacement of the non-descript term "heavy metals" by biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Path. Ser. 1*: 3-26.

**NIES D.H. (1999).** Microbial heavy-metal resistance. *App Microbiol. Biotech.*, 51:730-750.



**Ollivier B, Caumette P, Garcia JL et Mah RA. (1994).** Anaerobic bacteria from hypersaline environments *.Microbiol Rev* 58, 1:27–38.

**O.-P.-S. (1987).** Guías para la Calidad Del Agua Potable. Criterios relativos a la salud y otra información de base. Publicación científica 506. Organización Panamericana de la Salud, Washington, 350 pp.

**Oren, A. (2001).** The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. *Hydrobiologia* 466, 61-72.

**Oren, A. (2002).** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, 28, 56–63.

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

**Oren, A. (2002b).** Halophilic microorganisms and their environments. In: Seckbach J(ed) Cellular Origin and Life in Extreme Habitats. Kluwer Academic, Dordrecht. P.595.

**Oren, A. (2006).** Life at high salt concentrations. In The Prokaryotes, E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp.421–440.

**Oren A. (2006a).** Life at high salt concentrations. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E (eds) The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry. Springer, New York 2. Pp. 263-282.

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

**Oren A. (2011).** Diversity of halophiles, In: Horikoshi K. (ed.), Extremophiles Handbook, Springer: 1-1248



**Peduzzi R., Tonolla M., Boucher-Rodoni R. (2006).** Milieux extrêmes : Conditions de vie en milieu alpin et milieu marin, Actes et contributions scientifiques : 9.

**Phelan, J.M., Finnegan, D.L., Ballantine, D.S., Zoller, W.H., Hart, M.A. et Moyers, J. (1982).** Airborne aerosols measurements in the quiescent plume of Mount St. Helen in September 1980. *Journal of Geophysical Research*, 90(1093-1096).

**Popescu G. et Dumitru L. (2014).** Biosorption of Some Heavy Metals from Media with High Salt Concentrations by Halophilic Archaea. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23 : sup1, 791-795.

**Post, F. J. (1977).** Microbial Ecology of the Great Salt Lake. *MicrobEcol*3, 143-165.

**Pier-Anne, B. (2009).** Etude de l'effet de la contamination en métaux lourds sur *Frankia* spp. Et sa symbiose avec l'aulne noir (*Alnus Glutinosa* (L.) Gaertn). Thèse de Doctorat. Université de Sherbrooke.



**Rainey F.A., Zhilina T.N., Boulygina E.S., Stackebrandt E., Tourova T.P., Zavarzin G.A. (1995).** The taxonomic status of the fermentative halophilic anaerobic bacteria: description of *Haloanaerobiales* ord. nov., *Halobacteroidaceae* fam. nov., *Orenia* gen. nov. and further taxonomic rearrangements at the genus and species level. *Anaerobe* 1:185–199.

**Rejsek. F. (2002).** Analyse des eaux aspects réglementaires et techniques, Edition Centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine France.

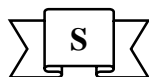
**Robert M. (1996).** Le sol, une interface dans l'environnement, une ressource pour le développement. Edité par Masson. Paris.

**Rodier J. (1996).** L'analyse de l'eau : Eaux naturelles, Eaux résiduares, Eaux de mer. 8<sup>ème</sup> édition, Dunod 1383 p.

**Roeler, M., Müller, V. (2002).** Chloride, a new environmental signal molecule involved in gene regulation in a moderately halophilic bacterium, *Halobacillus halophilus*. *J Bacteriol*, 184, 6207-6215.

**Roeler, M., Wanner, G., Müller, V. (2000).** Motility and flagellum synthesis in *Halobacillus halophilus* are chloride dependent. *J Bacteriol*, 182, 532-535.

**Ross, S. M. and Kaye, K. J. (1994).** 'The Meaning of Metal Toxicity in Soil-plant Systems' in S. M. Ross (ed.), *Toxic Metals in Soil-Plant Systems*, John Wiley & Sons, Chichester, pp. 27-62.



**Saba Shamim. (18 juillet 2018).** Biosorption des métaux lourds, Biosorption, Jan Derco et Branislav Vrana, IntechOpen, DOI : 10.5772/intechopen.

**SALLE B. (1999).** Étude de l'interaction laser-matériau appliquée à l'analyse élémentaire des solides. *Thèse de doctorat*, Université d'Orléans.

**Shotyk W. and G. Le Roux. (2005).** Biogeochemistry and Cycling of Lead. In *Metal Ions in Biological Systems* v.43. Edited by A. Sigel, H. Sigel and R. K.O. Sigel. Francis & Taylor Group. Pp. 247-249.

**Singleton P. (1999).** Bactériologie, *Edition Dunod 4<sup>ème</sup> édition*, Paris.415 p.

**Sleator, R. D., & Hill, C. (2002).** Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS microbiology reviews*, 26(1), 49-71.

**Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey L. (1997).** Proposal for a new hierarchical classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol* 47:79-491.



**Thombre R.S., Shinde V.D., Oke R.S., Dhar K.S et Shouche Y.S. (2016).** Biology and survival of Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula marismortui* RR12 isolated from Mumbai Salterns, India in response to salinity stress. *Scientific Reports* : 1-10.

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



**Vaisman N., Oren A. (2009).** *Salisaeta longa* gen. nov., sp. nov., a red, halophilic member of the Bacteroidetes. *Int J SystEvolMicrobiol*59:2571–2574.

**Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. (1998).** Biology of aerobic moderately halophilic *bacteria*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 504–544.

**Voica M.D., Bartha L, Banciu L.H et Oren A. (2016).** Heavy Metal Resistance in Halophilic Bacteria and Archaea: Minireview-physiology & Biochemistry. *FEMS Microbiology Letters*, 363:146.



**WEBB R.L., DICKINSON J.T., EXARHOS G.T. (1997).** Characterization of particulates accompanying laser ablation of NaNO<sub>3</sub>. *J. Appl. Spectrosc.* 51: 700-707.

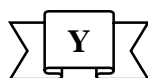
**Wedepohl, H.K., 1995.** The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(7): 1217-1232.

**Widyaningrum, T. dan T. Suharyanti. (2011).** Pengaruh Merkuri Klorida Terhadap Pertumbuhan Dan Histopatologi Ginjal Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*, Linn). Program Studi Pendidikan Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Seminar nasional VIII Pendidikan Biologi.

**Williams P.G., Ganadesigan M. et Ravikumar S. (2014).** Biosorption and Bio-Kinetic Properties of Solar Saltern Halobacterial Strains for Managing Zn<sup>2+</sup>, As<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> Metals. *Gimicrobiology Journal*, 30(3): 479-500.

**Wixson B. G., and B. E. Davies. (1993).** Lead in soil: Recommended guidelines. Science Reviews, Society for Environmental Geochemistry and Health, Northwood, Middlesex, England.

**Wright D. A. and P. Welbourn. (2002).** Environmental toxicology. Cambridge University Press. Pp.274-280.

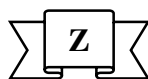


**Yachai, M. (2009).** *Carotenoid production by halophilic Archaea and its applications*. Thesis of Doctorat, university Prince of Songkla. P. 173.

**Yayanos, A. A., Dietz, A. S. and Van, Boxtel, R. (1979).** Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. *Science*, 205, 808-810.

**Yayanos, A. A. (1995).** Microbiology to 10,500 m in the deep sea. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 777–805.

**YS Ho., C.T Huang. (2002).** Equilibrium Sorption Isotherm for Metal Ions on Three Fern. School of public Health, Taipi Medical University, No.250 Wu.



**Zalar, P., De Hoog, G.S., Gunde-Cimerman, N. (1999).** Ecology of halotolerant *dothideaceous* black yeasts. *Studies in Mycology*, 43, 38–48.

**Zeng X, Birrien JL, Fouquet Y, Cherkashov G, Jebbar M, Querellou J. (2009).** *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile: extending the upper pressure-temperature limits for life. *ISME Journal* ; 1-4, Sous presse.

**Zhi X.Y., Li W.J., Stackebrandt E. (2009).** An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J SystEvolMicrobiol*59: 589–608.

**Zhilina T.N., Zavarzin G.A., Rainey F., Kevrim V.V., Kostrikina N.A., Lysenko A.M. (1996).** *Spirochaeta alkalica* sp. nov., *Spirochaeta Africana* sp. nov., and *Spirochaeta asiatica* sp. nov., alkaliphilic anaerobes from the continental soda lakes in Central Asia and the EastAfrican Rift. *Int J SystEvolMicrobiol*46: 305–312.

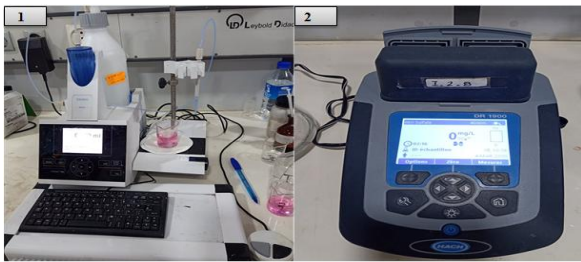


***Annexes***

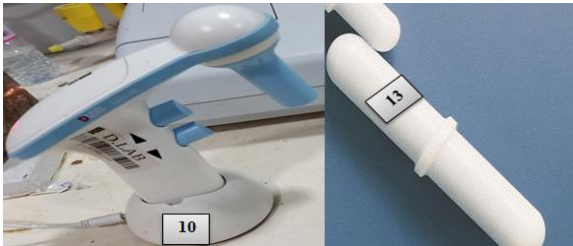
**Annexe n°1 : Méthodes opératoires d'analyses physico-chimiques des échantillons d'eau (matériels, les verreries, les réactifs).**

Les équipements	Les verreries	Les réactifs
<p><b>1.</b> Dosimètre.</p> <p><b>2.</b> Spectrophotomètre DR 1900.</p> <p><b>3.</b> PH mètre.</p> <p><b>4.</b> Acidimètre.</p> <p><b>5.</b> Turbidimètre.</p> <p><b>6.</b> Volumétrie muni d'un Agitateur magnétique.</p> <p><b>7.</b> Appareil de mesure Multi-paramètre.</p>	<p><b>8.</b> Pro pipette électronique.</p> <p><b>9.</b> Pissette d'eau distillée.</p> <p><b>10.</b> Eprouvette graduée.</p> <p><b>11.</b> Barreau aimante.</p> <p><b>12.</b> Fiole jaugée.</p> <p><b>13.</b> Bécher.</p> <p><b>14.</b> Cuve.</p> <p>Burette.</p> <p>Pipette.</p>	<p><b>15.</b> .Acide éthylènediamine tetraacétique (EDTA).</p> <p><b>16.</b> Le chromate de potassium (<math>K_2CrO_4</math>).</p> <p><b>17.</b> Solution de NaOH à 20 %.</p> <p><b>18.</b> Tri éthylène amine (TEA).</p> <p><b>19.</b> Solution tampon à PH=10.</p> <p><b>20.</b> Noir erichrome à 0.5%.</p> <p><b>21.</b> Murixide.</p> <p><b>22.</b> Sulfate.</p>

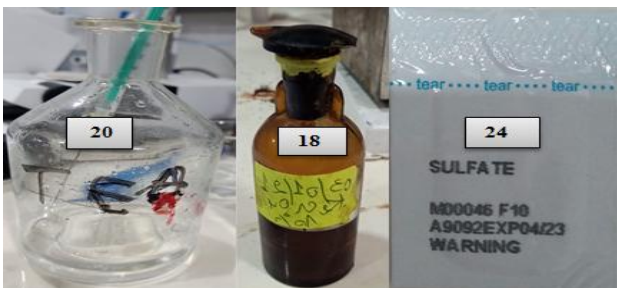
❖ Les équipements utiliser pour l'analyse physicochimique d'eau (Photographie original).



❖ Les verriers utiliser l'analyse physico-chimique d'eau (Photographie original).



❖ Les produits utiliser pour l'analyse physicochimique d'eau (Photographie original).



Annexe n°02 : Mesure du pH.

✚ Appareillages :

- Electrode de verre : à l'intérieur se trouve l'électrode de référence formant le relais (calomel-KCl). La partie utile de l'électrode de verre est formée par une ampoule sphérique de 1 cm de diamètre.

- Dispositif potentiométrique : spécialement conçus pour la mesure du pH, alimenté en courant constant.
- Bécher de 50 ml de volume.
- Agitateur magnétique.

 **Mode opératoire :**

Un volume de 50 ml d'eau à analyser a été prélevé dans un bêcher propre l'électrode du pH mètre et rincée avec de l'eau distillée puis placé sous l'agitateur magnétique, ce dernier est introduit dans l'échantillon, la valeur sera affichée par l'appareil après stabilisation **(Laboratoire d'environnement CRD)**.

**Annexe n°03 : Mesure de la turbidité.**

 **Mode opératoire :**

- Prélever 50 ml d'eau à analyser et mettre dans une cuve, qui doit être propre et exempte de dépôt, de taches, de buée ou de marque susceptible d'affecter le faisceau lumineux.
- La valeur de la turbidité sera affichée par l'appareil dès la première lecture.

La turbidité est exprimée en NTU (nephelometric turbidity unit) **(Laboratoire d'environnement CRD)**.

**Annexe n°04 : Mesure de la conductivité.**

 **Mode opératoire :**

- Rincer plusieurs fois la sonde de multiparamètre, puis la plonger dans un récipient contenant de l'eau à examiner.
- Agiter le liquide afin que la concentration ionique entre les électrodes soit identique, Cette agitation permet aussi d'éliminer les bulles d'air sur les électrodes.
- Opérer à une température de référence 20°C, ensuite noter la valeur donnée par le conductimètre **(Laboratoire d'environnement CRD)**.

**Annexe n°05 : Préparation d'une dilution.**

 **Appareillages**

- Pipette.
- Fiole jaugée.
- Propipette électronique.

- Pissette d'eau distillée.


 **Mode opératoire :**

- Introduire l'échantillon d'eau à analyser dans un bécher.
- Prélever cet échantillon à l'aide d'une pipette Préablement rincée.
- Verser un volume de l'échantillon d'eau à analyser dans une fiole jaugée qui contient un peu d'eau distillé.
- Boucher la fiole et homogénéiser.
- Ajouter encore de l'eau distillé jusqu'au trait de jauge.
- Boucher la fiole et homogénéiser la solution (**Laboratoire d'environnement CRD**).

**Annexe n°06 : Dosage du Calcium par complexométrie.**

 **Appareillages :**

- Bécher.
- Barreau.
- Dosimètre.


 **Mode opératoire :**

Un volume de 25 ml d'eau à analyser a été prélevé dans un bêche, puis 5 gouttes de solution de NaOH de 20 %, 5 gouttes de tri éthylène amine (TEA) et une très petite quantité de murexide ont été ajoutés. A cette solution, une quantité nécessaire d'EDTA a été ajouté goutte à goutte jusqu'au virage de coloration du rose au bleu (violet) (**Laboratoire d'environnement CRD**).

**Annexe n°07 : Dosage du Magnésium par complexométrie.**

 **Appareillages :**

- Bécher.
- Barreau.
- Dosimètre.

 **Mode opératoire :**

Pour le dosage du magnésium, un volume de 25 ml d'eau à analyser a été prélevé, puis 5 gouttes d'une solution tampon ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) à  $\text{pH} = 10$  a été ajouté, suivi de 3 gouttes de noir erichrome à 0.5% et quelques gouttes de triéthylène amine (TEA). Une quantité nécessaire de solution (EDTA) a été additionné jusqu'au virage, de rouge brunâtre au bleu, le volume  $V_2$  d'EDTA versé est noté (**Laboratoire d'environnement CRD**).

### Annexe n°08 : Dosage du Chlorure par volumétrie.

#### ✚ Appareillage :

- Volumétrie.
- Burette.
- Agitateur.

#### ✚ Mode opératoire :

Une prise d'essai de 10 ml d'eau à analyser a été prélevée dans un bécher, puis 3 à 5 gouttes d'indicateur ont été additionnées, une coloration rouge est obtenue après avoir titré avec une solution d'AgNO<sub>3</sub> (**Laboratoire d'environnement CRD**).

### Annexe n°09 : Dosage des Carbonates et des Bicarbonates par acidimétrie.

#### ✚ Appareillage :

- pH mètre.
- Agitateur.
- Bêcher.
- Barreau.

#### ✚ Mode opératoire :

Une prise d'essai de 50 ml d'eau à analyser a été versée dans un Bêcher, puis placé sur un agitateur électromagnétique, ensuite le pH de cette solution a été mesuré à l'aide d'un pH mètre munie d'une électrode de référence en verre et une solution tampon à pH= 10 (**Laboratoire d'environnement CRD**).

- Si le pH est supérieur à 8.3 on dit qu'il y a présence de carbonates dans l'échantillon, on titre alors avec l'acide chlorhydrique à 0.05N jusqu'à un pH= 8.3, et on note le volume d'HCl ajouté.
- Si le pH est inférieur à 8.3, on dit qu'il y a présence de bicarbonates HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, on titre avec une solution de HCl à 0.05N jusqu'à ce que l'on obtient un pH= 4.3 et on note le volume d'acide ajouté.

### Annexe n°10 : Dosage des Sulfates

#### ✚ Appareillages :

- Spectrophotomètre DR 1900.
- Cuvette.
- Bécher.

### ✚ Mode opératoire :

Dans un premier temps le spectrophotomètre doit être équilibré par étalonnage.

La cuvette doit être propre et exempte de dépôt, de taches, de buée ou de marque susceptible d'affecter le faisceau lumineux.

Un volume de 10 ml d'eau à analyser a été prélevé puis le réactif de sulfate a été ajouté dans une cuvette qui va être introduit dans le spectrophotomètre (**Laboratoire d'environnement CRD**).

### Annexe n°11 : Liste des verreries, appareillage et réactifs utilisés

Les verreries et matériels	Appareillage	Réactifs et produits utilisés
Micropipette	Balance	Eau distillée
Bécher	Bec bunsen	Violet de gentiane
Les emboues bleus	Incubateur agitateur	Lugol
Erlenmeyers	Autoclave	Alcool à 95%
éprouvette	Réfrigérateur	Fichsine
Tubes à essais	pH mètre	Huile à immersion
lame	spectrophotomètre	
Lamelle	Etuve	
Spatule	Centrifugeuse	
Barreau magnétique		
Cuves en plastique		
Pipette pasteur		
Les tubes coniques de 45ml		



**Figure 01 : Coloration de Gram par l'appareil Color Gram. (Photographie original)**

#### **✚ Le mode opératoire de l'état frais :**

- Prélever une goutte de culture à la pipette pasteur avec les précautions de stérilité habituelles.
- La déposer au milieu d'une lame propre.
- Poser ensuite délicatement la lamelle. La goutte doit être suffisante mais proportionnée à la lamelle choisie (le liquide ne doit pas déborder).

#### **✚ Mode opératoire de coloration de Gram**

##### **▪ Préparation du frottis :**

Une goutte de la suspension bactérienne étudiée est déposée sur une lame puis étalée à l'aide d'une pipette pasteur stérile de façon à obtenir un frottis qui doit être mince, homogène et régulier. Le séchage et la fixation se fait par agitation horizontale de la lame dans l'air chaud au-dessus de la flamme du bec bunsen.

##### **▪ Double coloration de Gram :**

- Recouvrir le frottis d'une solution de violet de gentiane, laisser agir 1min.
- Rejeter le colorant en l'entraînement avec une solution de lugol, laisser agir 30sec à 1min.
- Laver à l'eau courante.
- Décolorer par l'alcool 70%, versé goutte à goutte sur la lame inclinée.
- Laver abondamment à l'eau.
- Recouvrir de fuchsine et laisser 30sec à 1min.
- Laver, sécher et examiner à l'objectif à immersion.

L'étape de double coloration de Gram a été réalisée au niveau de la CRD par un appareil « Color Gram » programmé pour l'application des étapes précédentes et qui finit par donner le frotti final prêt à l'observation durant 5min.

**Annexe n°12 : Composition du milieu SH liquide.**

<b>Le composant</b>	<b>La quantité</b>
<b>NaCl</b>	<b>125g</b>
<b>MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O</b>	<b>60g</b>
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>5g</b>
<b>CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.1g</b>
<b>Extrait de levure</b>	<b>1g</b>
<b>Amidon</b>	<b>2g</b>
<b>Tryptone</b>	<b>1g</b>
<b>L'eau distillée</b>	<b>1000ml</b>
<b>pH</b>	<b>7.5</b>

- composition du milieu SH solide.**

<b>Le composant</b>	<b>La quantité</b>
<b>NaCl</b>	<b>75g</b>
<b>MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O</b>	<b>50g</b>
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>2.5g</b>
<b>CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.05g</b>
<b>Extrais de levure</b>	<b>1.5g</b>
<b>Amidon</b>	<b>1g</b>
<b>L'eau distillée</b>	<b>500ml</b>
<b>Agar</b>	<b>10g-15g</b>

## Annexe n°13 : les préparations des cultures en présence du mercure.



**Figure 02 :** La culture de la souche 3 a différentes concentrations (1ppm, 2ppm, 5ppm et 10ppm) du mercure. (Photographie originale)



**Figure 03 :** La culture de la souche 5 a différentes concentrations (1ppm, 2ppm, 5ppm et 10ppm) du mercure. (Photographie originale)



**Figure 04 :** La culture de la souche 5 a différentes concentrations (1ppm, 2ppm, 5ppm et 10ppm) du mercure. (Photographie originale)

## Annexe n°14 : valeurs de la DO à 600nm pour le mercure des souches (S1, S2, S3, S4, S5, S6 et S7).

DO	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
$\lambda=$ 600nm	0.239	0	0.993	0	0.534	0.326	0.787



### Annexe n° 18 : Tableau des propriétés physico-chimique des écosystèmes salés terrestres et marins.

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

\* Salinité et ions sont représentés en g l<sup>-1</sup>, n.d. non déterminé. N.D., Non-déteçté.



# ***Résumé***

## Résumé

Les premiers organismes extrémophiles isolés font partie des organismes halophiles, découverts dans un environnement qu'on croyait dépourvu de vie. Les conditions de vie non conventionnelle nous laissent penser que ces microbes de l'extrême ont mis en place des stratégies pour s'adapter aux stress physicochimiques auxquels ils sont confrontés.

Notre travail a été réalisé dans le but de mettre en évidence l'efficacité des microorganismes halophiles à survivre dans des milieux contaminés par les métaux lourds (le mercure en particulier). Pour cela nous avons exposées différentes souches halophiles à des concentrations croissantes de mercure (1 ppm, 2ppm, 5ppm et 10ppm), les résultats des cinétiques de croissances cellulaire obtenus ont révélé que trois souches sur sept ont toléré la présence du mercure, les souches S3 et S7 ont montré une bonne croissance à des concentrations de 1 et 2ppm tandis que la souche S5 une croissance moyenne à 1ppm de HgCl<sub>2</sub>. Par comparaison aux cultures des témoins sans métal, une modification de l'intensité de pigmentation rouge-orange (pigments caroténoïdes) des cultures a été remarquée aussi.

Ce travail suggère que les souches halophiles étudiées pourraient être de bons candidats notamment en bioremédiation des milieux salins contaminés au mercure.

**Les mots clés :** Souches halophiles, métaux lourds, mercure, bioremédiation, pigments caroténoïdes.

## Abstract

The first isolated extremophiles are among the halophilic organisms, discovered in an environment thought to be devoid of life. The unconventional living conditions lead us to believe that these extreme microbes have strategies in place to adapt to the physicochemical stresses they face.

Our work was carried out with the aim of demonstrating the effectiveness of halophilic microorganisms to survive in environments contaminated by heavy metals (mercury in particular). For this, we exposed different halophilic strains to increasing concentrations of mercury (1 ppm, 2ppm, 5ppm and 10ppm). The results of the cell growth kinetics obtained revealed that three strains out of seven tolerated the presence of mercury, the S3 strains and S7 showed good growth at concentrations of 1 and 2 ppm while strain S5 averaged growth at 1ppm HgCl<sub>2</sub>. Compared to the cultures of the metal-free controls, a change in the intensity of red-orange pigmentation (carotenoid pigments) of the cultures was also noted.

This work suggests that the halophilic strains studied could be good candidates, particularly in the bioremediation of saline environments contaminated with mercury.

**Key words:** Halophilic strains, heavy metals, mercury, bioremediation, carotenoid pigments.

## المخلص

أول الكائنات القاسية المعزولة هي من بين الكائنات المحبة للملوحة، اكتُشفت في بيئة يُعتقد أنها خالية من الحياة. تفودنا الظروف المعيشية غير التقليدية إلى الاعتقاد بأن هذه الميكروبات المتطرفة لديها استراتيجيات للتكيف مع الضغوط الفيزيائية والكيميائية التي تواجهها.

تم تنفيذ عملنا بهدف إظهار فعالية الكائنات الحية الدقيقة المحبة للملوحة للبقاء على قيد الحياة في البيئات الملوثة بالمعادن الثقيلة (الزئبق على وجه الخصوص). لهذا قمنا بتعريض سلالات مختلفة من المحبة للملوحة لتركيزات متزايدة من الزئبق (1 جزء في المليون، 2 جزء في المليون، 5 جزء في المليون و10 جزء في المليون)، أظهرت نتائج حركية نمو الخلايا التي تم الحصول عليها أن ثلاث نمو جيد بتركيزات 1 و2 جزء في المليون بينما سلالة S3 و S7 سلالات من أصل سبعة تحملت وجود الزئبق، وأظهرت سلالات بالمقارنة مع ثقافات عناصر التحكم الخالية من المعادن، لوحظ أيضًا تغيير في HgCl<sub>2</sub> متوسط النمو عند 1 جزء في المليون S5 شدة تصبغ الأحمر البرتقالي (أصباغ كاروتينويد) للمزارع.

يشير هذا العمل إلى أن السلالات المحبة للملوحة التي تمت دراستها يمكن أن تكون مرشحة جيدة، لا سيما في المعالجة الحيوية للبيئات المالحة الملوثة بالزئبق.

**الكلمات الرئيسية:** السلالات المحبة للملح، المعادن الثقيلة، الزئبق، المعالجة الحيوية، أصباغ الكاروتين.