



Année Universitaire : 2009-2010



Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne  
**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

*Isolément, caractérisation et identification des  
bactéries halophiles à partir des marais salants de  
la région d'El jadida.*

Présenté par:

**AMAKRANE Sihame**

Encadré par:

**-Pr AMAR Mohammed**

**-Dr Ouadghiri Mouna**

**Soutenu Le 25 Juin 2008 devant le jury composé de:**

- **Pr. AMAR Mohamed**                      **Responsable du LMBM (CNRST)**
- **Pr. IRAQUI H. Mohamed**              **Professeur à la FST de Fès**
- **Pr. FIKRI BENBRAHIM Kawtar**      **Professeur à la FST de Fès**
- **Pr. HOUARI Abdellah**                  **Professeur à la FST de Fès**

**Stage effectué au: Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire(LMBM)  
relevant du Centre National de Recherche Scientifique et Technique (CNRST)**



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Nom et prénom: AMAKRANE Sihame**

**Année Universitaire : 2009/2010**

**Titre: Isolement, caractérisation et identification des bactéries halophiles à partir des marais salants de la région d'Eljadida .**

### **Résumé**

Ce présent travail intéresse les bactéries halophiles isolées à partir de marais salants et d'une lagune salée dans la région d'Eljadida au Maroc à savoir : les marais salant de Sidi Moussa et de Sidi Abed et la lagune d'Oualidia.

54 isolats ont été purifiés, cryoconservés et analysés phénotypiquement et génotypiquement, l'analyse phénotypique montre qu'il s'agit de bactéries dont 72% sont des Gram positif et 28% Gram négatif, la forme bacillaire prédomine avec 85% alors que la forme cocci présente 15%.

100% des isolats poussent à 2 ; 3 et 5% de NaCl ,71% poussent en absence de sel. Ce sont des halotolérants alors que 29% qui n'arrivent pas à pousser en absence de sel et sont caractérisés comme des halophiles. 67% d'isolats tolèrent 10% de NaCl et 9% seulement arrivent à pousser sur 20% de NaCl.

La croissance des isolats à différentes températures montre que les 54 isolats poussent à des températures mésophiles 30 et 37°C. 33% poussent à 10°C et 20% poussent à 55°C. 41% d'isolats ont pu résister à un traitement thermique de 80°C pendant 10 minutes.

La production de 4 enzymes extracellulaires (cellulase, amylase, protéase et lipase) a été étudiée, et il s'est avéré que 72,22% des isolats sont capables de produire au moins une enzyme dont 55% d'isolats ont une activité protéase, 30% ont une activité amylase, 13% ont une activité cellulase et 2% seulement ont une activité lipase.

L'étude génotypique par la BORA1R-PCR des 39 isolats ayant au moins une activité enzymatique a montré qu'il s'agit d'un groupe hétérogène. Aucun isolat n'a été groupé avec les souches de référence de la base de données disponible au LMBM. Cependant, 4 clusters ont regroupé 11 isolats entre eux avec un pourcentage de similitude supérieur à 80%.

**Mots clés: halophiles, extrêmophiles, rep-PCR, BOXA1R,**



## *Avant-propos*

Ce mémoire est présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master sciences et techniques « Biotechnologie microbienne » à la Faculté des Sciences et Techniques, Fès, Saiss. Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie et de Biologie Moléculaire (LMBM) relevant du Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST), Rabat, sous la direction de son responsable Monsieur le Professeur **Mohamed AMAR**.



## Sommaire

*Introduction générale..... Erreur ! Signet non défini.*

- I. *Présentation de la zone d'étude :..... Erreur ! Signet non défini.*
1. *Localisation générale :..... Erreur ! Signet non défini.*
  2. *Les marais salants :..... Erreur ! Signet non défini.*
  3. *Données climatiques de la région :..... Erreur ! Signet non défini.*
- II. *Les microorganismes halophiles :..... Erreur ! Signet non défini.*
1. *Le sel et les microorganismes halophiles :..... Erreur ! Signet non défini.*
  2. *Diversité et phylogénie des halophiles :..... Erreur ! Signet non défini.*
  3. *Habitats des bactéries halophiles :..... Erreur ! Signet non défini.*
  4. *Mécanismes d'adaptation des halophiles au milieu hypersalin :Erreur ! Signet non défini.*
  5. *Applications biotechnologique des bactéries halophiles:Erreur ! Signet non défini.*
  6. *Méthodes d'identification des bactéries halophiles :Erreur ! Signet non défini.*

### *Matériel et Méthodes*

- I. *MATÉRIEL ..... Erreur ! Signet non défini.*
1. *Echantillonnage ..... Erreur ! Signet non défini.*
  2. *Milieux de culture :..... Erreur ! Signet non défini.*
- II. *Méthodes :..... Erreur ! Signet non défini.*
1. *Isolement :..... Erreur ! Signet non défini.*
  2. *Cryoconservation des isolats :..... Erreur ! Signet non défini.*
  3. *Etude phénotypique des isolats :..... Erreur ! Signet non défini.*



4. *Etude de la croissance bactérienne en fonction de la concentration de NaCl* :..... **Erreur ! Signet non défini.**
5. *Etude de la croissance en fonction de la température* :**Erreur ! Signet non défini.**
6. *Test de sporulation* :..... **Erreur ! Signet non défini.**
7. *Révélation de l'activité de certains enzymes extracellulaires***Erreur ! Signet non défini.**
8. *Etudes génotypique des isolats* :..... **Erreur ! Signet non défini.**

### Résultats et Discussion

- I. *Analyse physicochimique des échantillons* :..... **Erreur ! Signet non défini.**
- II. *Analyse microbiologique* :..... **Erreur ! Signet non défini.**
  1. *Isolement et étude phénotypique et enzymatique* :**Erreur ! Signet non défini.**
  2. *Croissance en fonction de Na Cl* :..... **Erreur ! Signet non défini.**
  3. *Croissance en fonction de la température* :... **Erreur ! Signet non défini.**
- III. *Production d'enzymes extracellulaires* :..... **Erreur ! Signet non défini.**
- IV. *Etude génotypique des isolats* :..... **Erreur ! Signet non défini.**
  1. *Résultats de la BOXA1R-PCR* :..... **Erreur ! Signet non défini.**
  2. *Analyse des profils électrophorétiques par le logiciel BioNumerics* :  
**Erreur ! Signet non défini.**

*Conclusion et perspectives.* **Erreur ! Signet non défini.**

*Références bibliographiques* **Erreur ! Signet non défini.**

Annexes.....  
.....56



## *Introduction générale*

Les environnements considérés par l'homme et la plupart des organismes supérieurs comme extrêmes en termes de température, pression, pH et salinité sont souvent colonisés par des micro-organismes, auxquels on a donné le nom d'extrémophiles. Ces derniers, bien adaptés à ces conditions physico-chimiques particulières, sont capables d'en tirer l'énergie nécessaire pour leur croissance et leur métabolisme.

Parmi ces microorganismes, on trouve les bactéries halophiles qui exigent plus ou moins de fortes concentrations en sel pour leur croissance. Ces bactéries colonisent des habitats salés tels que les eaux de mers, les lacs alcalins salés, les marais salants... et peuvent vivre dans une large gamme de salinité allant de 10 jusqu'à 300g/l.

La production d'enzymes et d'autres composés résistants aux sels est d'un grand intérêt pour les biotechnologies qui recherchent des molécules capables d'opérer dans les conditions particulièrement difficiles rencontrées dans de nombreux procédés industriels. De nos jours, les bactéries halophiles sont considérées comme une source potentielle de métabolites secondaires à grande valeur ajoutée.

Sur la côte atlantique du Maroc dans la région d'Eljadida, des marais salants se situent entre Sidi Abed et Oualidia, les caractéristiques de la région leurs procurent un bon fonctionnement en terme d'évaporation et d'imperméabilité. Etant donné les caractéristiques du site en terme de salinité, une investigation orientée vers l'étude des bactéries halophiles de cette zone a été envisagée.



Nous nous proposons dans ce travail, de caractériser et d'identifier des isolats de bactéries halophiles provenant des sédiments du site de la région d'Eljadida. Cette identification sera basée sur le typage moléculaire utilisant la technique de la rep-PCR avec une amorce BOXA1R décrite comme étant la meilleure pour typer les bactéries de l'environnement.

## I. MATERIEL.

### 1. Echantillonnage :

Les prélèvements sont effectués dans des flacons stériles gardés à 4°C à partir de sédiments des marais salants de Sidi Moussa, marais salants de Sidi Abed et la lagune d'Oualidia (figure3) et acheminés immédiatement au laboratoire. Une mesure de température et pH est effectuée sur le lieu du prélèvement, la salinité est mesurée une fois arrivé au laboratoire.

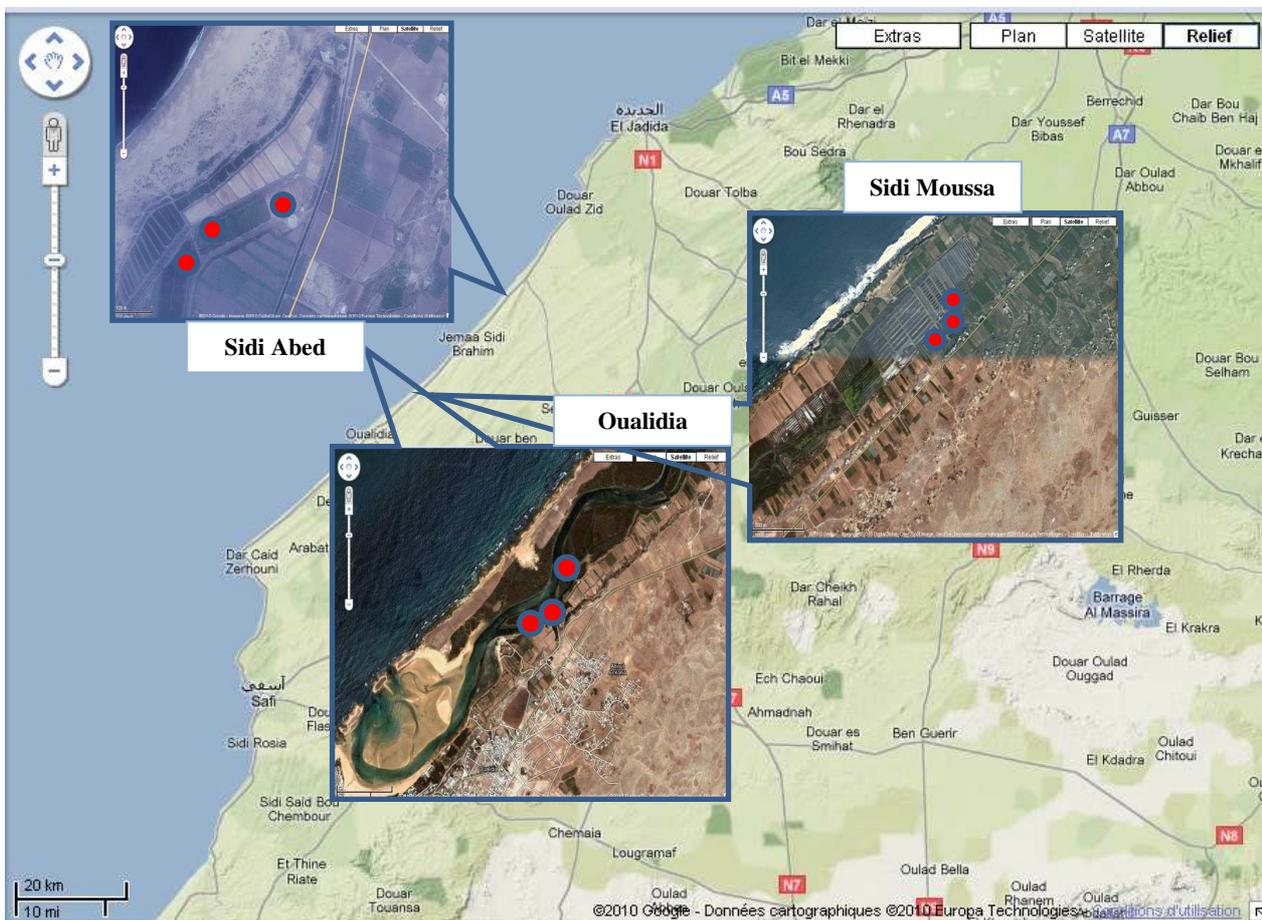




Figure 3 : Carte montrant les trois sites de prélèvement

## 2. Milieux de culture :

Les milieux utilisés pour l'isolement, la culture et l'étude des bactéries halophiles sont : le milieu Tryptone Soy Agar (TSA) et le (Tryptone Soy Broth) TSB (voir composition en annexes) (N. Sadfi-Zouaoui et al., 2007). Les milieux sont additionnés de différentes concentrations de sel : 2%, 3%, 5%, 10%, 20%.

## II. Méthodes :

### 1. Isolement :

On prélève 15g de sédiment auxquels on additionne 15 ml d'eau saline à 5% ; ce qui représente notre solution mère. A partir de cette solution on effectue une série de dilutions décimales dans de l'eau saline à 5% dans un volume final de 10 ml jusqu'à la dilution  $10^{-5}$ .

À partir de chaque dilution on prélève 100  $\mu$ l qu'on étale sur des boîtes contenant le milieu TSA à 3 concentrations de NaCl : 2, 3 et 5% de NaCl

Après une incubation à 30°C pendant 24, 48 et 72h, le dénombrement est effectué et les colonies montrant des aspects différents sont repiquées afin de les purifier. Un deuxième repiquage est nécessaire pour une bonne purification des isolats.

### 2. Cryoconservation des isolats :

La cryoconservation est réalisée à -80°C en présence de **15%** de glycérol (cryoprotecteur permettant de conserver les bactéries intactes en évitant leur cristallisation comme suit :

Une colonie est prélevée du milieu gélosé TSA et mis en culture dans 5 ml du milieu liquide TSB +n% de NaCl (n%= pourcentage de NaCl sur lequel pousse nos isolats) .

Les cultures sont incubées à 30°C pendant 24h (jusqu'à obtention d'un culot)

4.25 ml sont prélevées de cette culture à laquelle on ajoute 0.75 ml du glycérol stérile (15%) et qu'on homogénéise à l'aide d'un vortex.

5ml sont partagés sur 5 tubes eppendorfs (à raison de 1 ml par tube) et mis à -80°C.



### 3. *Etude phénotypique des isolats :*

#### ➤ Caractères cultureux :

L'étude des caractères cultureux comprend l'aspect, le diamètre, la forme, le contour et la couleur des colonies sur le milieu TSA +n% de NaCl.

#### ➤ Etude microscopique : coloration de Gram :

La coloration de Gram nous permet d'avoir une information rapide sur la morphologie des bactéries, leur type de Gram, leur forme, leur mode de groupement, ainsi que leur degré de pureté. Ce test est réalisé selon le protocole décrit par Prescott L.M. (Prescott L.M et al. 2003).

#### ➤ Etude enzymatique :

##### • Recherche de la catalase :

Cette activité a été réalisée selon le protocole expérimental décrit par Prescott L.M.

(Prescott L.M et al. 2003). Ce test consiste à mettre une colonie prélevée du milieu gélosé

TSA à l'aide d'une anse en plastique stérile dans de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il y a production de l'enzyme catalase et que le test est positif.

##### • Recherche de l'oxydase :

L'activité oxydase a été déterminée selon le protocole décrit par Kovacs (1995). Une

colonie est prise du milieu gélosé TSA et mise sur papier Watman et à laquelle on ajoute le réactif de l'oxydase. Le développement d'une couleur bleue signifie que le test est positif et que l'isolat possède l'enzyme oxydase (Prescott L.M et al. 2003).

### 4. *Etude de la croissance bactérienne en fonction de la concentration de NaCl :*

5ml du milieu TSB additionné de différentes concentrations de NaCl

(0%,3%,5% ,10%,20%) sont inoculés par une colonie de chaque isolat à l'aide d'une anse stérile, les tubes sont incubés à 30°C pendant 24, 48 et 72h, l'apparition d'un trouble témoigne d'une croissance de l'isolat.



## 5. *Etude de la croissance en fonction de la température :*

Une colonie de chaque isolat est inoculée dans 5 ml du milieu TSB +n % de NaCl, les tubes sont incubés à 10, 30, 37, et 50°C pendant 24, 48 et 72h.

La croissance est détectée par la formation d'un trouble dans le tube.

## 6. *Test de sporulation :*

Une culture fraîche de 24 h de chaque isolat (5ml) est incubée 10 minutes à 100°C ; ensuite 5 µl de chaque culture sont déposés sur des boîtes contenant le milieu TSA+n% de NaCl et incubé à 30 °C pendant 24 et 48h. Ce test a pour but de mettre en évidence une éventuelle formation de spores par nos isolats.

## 7. *Révélation de l'activité de certains enzymes extracellulaires :*

### ➤ Cellulase :

Les isolats sont cultivées sur le milieu TSA (+ n% NaCl) + 10g/l de cellulose, les boîtes sont incubées 48h à 30°C.

Après croissance, les colonies sont inondées par une solution de rouge congo (1mg/ml) pendant 15 minutes. Puis une solution de NaCl à 1M est additionnée pendant 15 minutes.

L'apparition des halots autour des colonies témoigne de la production de cellulase.

(N .Sadfi-Zouaoui et al., 2007).

### ➤ Amylases :

Les isolats sont cultivées sur le milieu TSA (+n% NaCl) + 5g/l d'amidon, les boîtes sont incubées 48h à 30°C, après croissance les colonies sont inondées par une solution de lugol, l'apparition de zones claires autour des colonies montre une hydrolyse d'amidon (Cowan. 1991).

### ➤ Protéases :

Afin de révéler l'activité protéolytique, les isolats sont cultivés sur un milieu à base de lait :

- Lait écrémé : 500g/l
- NaCl : n g/l
- Extrait de levure : 5g/l
- Peptone : 1%
- Agar : 20g/l



Après croissance, des zones de précipitation de la paracaséine autour des colonies témoignent de l'activité protéolytique.

(N .Sadfi-Zouaoui et al., 2007)

### ➤ Lipases :

Les isolats sont cultivés sur le TSA(+ n% NaCl) additionné du Tween 80 (10g/l)

Une zone d'hydrolyse apparaît après croissance autour des colonies productrices de lipase.

(Sierra, 1957).

## 8. Etudes génotypique des isolats :

Après une extraction de l'ADN génomique, l'identification génotypique des isolats est réalisée à l'aide de la rep-PCR (Repetitive Extrinsic Palindromic-Polymérase Chaîne Reaction) en utilisant l'amorce BOXAIR.

### ➤ Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée selon le protocole décrit par (Geert Huys , 2003) . Le protocole est réalisé comme suit :

- Quelques colonies sont transférées dans un tube ependorff contenant 500µl de la solution RS afin d'éliminer la majorité d'exopolysaccharides
- La suspension est ensuite centrifugée 2 minutes à 13000 rpm(rotation par minute)
- Elimination du surnageant et resuspension du culot dans 150µl d'une solution de lysosyme puis incubation à 37°C pendant 40 minutes afin de dénaturer la paroi des bactéries.
- Ajout de 500 µl de GES (Guanidium-thiocyanate-EDTA-Sarkosyl), la solution est ensuite mélangée doucement à l'aide de micropipette jusqu'à l'obtention d'une solution transparente qu'on laisse reposer 10 minutes dans la glace. Cette étape permet la lyse totale des cellules.
- Ajout de 250µl de NH<sub>4</sub>Ac(7,5 M) ( Acétate d'ammonium), la solution est remise 10 minutes dans la glace afin de précipiter les protéines.
- Ajout de 500µl de chloroforme/alcool isoamélique (24/1) puis centrifugation du mélange 20 minutes à 13000 rpm afin de séparer les trois phases :la phase supérieure aqueuse contenant les acides nucléiques, la phase du milieu contenant les protéines, et la phase inférieure correspondant à la phase de chloroforme.
- Transfert de la phase supérieure (700µl) dans un autre tube sur lequel on rajoute 378µl d'isopropanol pour précipiter les acides nucléiques. Le tube est centrifugé 10 minutes à 13000 rpm.
- Lavage du culot deux fois avec 150µl d'éthanol à 70% pour précipiter les sels.
- Séchage du culot et resuspension dans 100 µl de TE ×1 (Tris-HCl,EDTA).
- Ajout de 5µl d'ARNase (2g/ml) est incubation 1 heure à 37°C.



➤ Amplification des ADN par la BOXA1R :

Avant amplification des ADN, on réalise une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% afin de vérifier la qualité et la quantité des ADN. L'amplification par rep-PCR est réalisée suivant le protocole décrit par (Versalovic et al., 1997) en utilisant l'amorce BOXA1R, qui reste l'amorce la plus utilisée pour l'identification des isolats de l'environnement isolés à partir de biotopes naturels. Le mélange réactionnel (mastermix) contient les réactifs montrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : Mélange réactionnel de la rep-PCR BOXA1R, et leurs volumes correspondant.

Mélange réactionnel	Volume par réaction (µl)
Eau distillée stérile	13,45
Gitshier buffer 5*	5
BSA(Serum Albumine Bovine) (10mg/ml)	0,4
DMSO(Diméthylsulfoxyde) (100%)	2,5
dNTP(désoxyribonucléotides) (25mM)	1,25
Amorce (0,3µg /µl)	1
Taq polymérase (5U/µl)	0,4
ADN	1
<b>Total</b>	<b>25</b>

On prépare un mélange réactionnel pour l'ensemble des isolats étudiées qu'on le partage ensuite à raison de 24 µl par eppendorf. Pour chaque isolat on ajoute 1µl d'ADN .La réaction de PCR est effectuée dans un thermocycleur (Applied Biosystem) selon le cycle suivant :

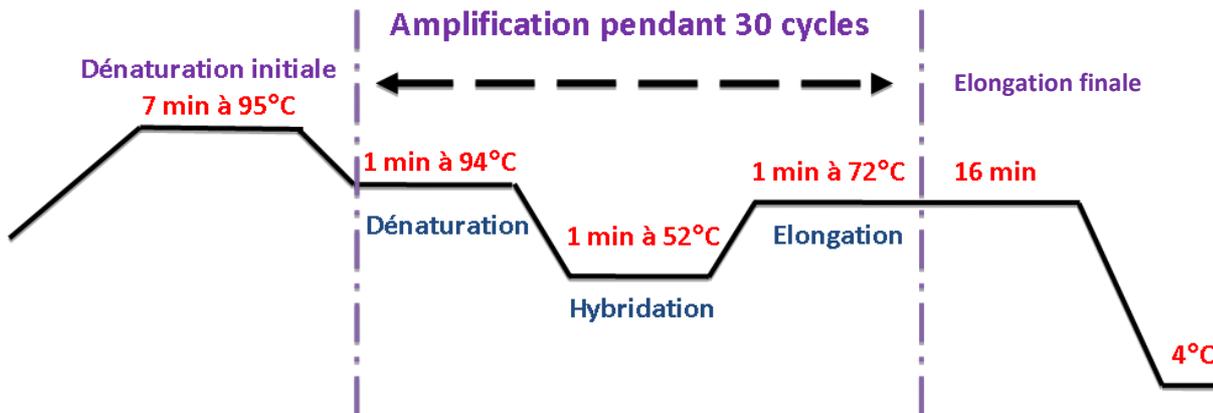


Figure 4 : Cycle de PCR utilisé pour la BOXA1R.

Après amplification, 3  $\mu$ l de produits PCR sont mélangés avec 1  $\mu$ l de la solution de charge (*loading dye*) sont déposés sur un mini gel d'agarose (1%) soumis à un voltage de 70V et 150mA pendant 30 min.

#### ➤ Electrophorèse sur gel d'agarose :

Les produits de la BOXA1R-PCR ainsi que des marqueurs de poids moléculaire sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%) en présence du tampon TAE (x1)(Tris Acétate EDTA). On dépose 8  $\mu$ l de produits BOXA1R-PCR avec 1.6  $\mu$ l de la solution de charge. Parallèlement, 6  $\mu$ l des marqueurs de poids moléculaire ont été déposés au milieu et aux extrémités du gel. Après électrophorèse pendant 18h (voltage de 35V et 150 mA) à 4°C, le gel est coloré dans un bassin contenant une solution de 1 litre de TAE (x1) additionné de BET (100  $\mu$ l BET/1l de TAE(x1) pendant 30 min puis rincé dans 1l de TAE (x1) pendant 10 à 15 min. Le gel est ensuite observé sous lumière ultraviolette à 254 nm et photographié en utilisant une caméra numérique (CCD Camera 570 LTV-Gel SMART, France).

#### ➤ Traitement du gel par le logiciel BioNumerics :

Le logiciel **BioNumerics** (Applied Maths, Sint-Martens-Latern, Belgium) est un logiciel bioinformatique utilisé pour le traitement des gels obtenus et la gestion des bases de données appartenant aux CCMM. Ce logiciel permet de traiter les gels, de les standardiser en comparant les bandes obtenues à des marqueurs de poids moléculaires.

Le gel obtenu est traité en effectuant une délimitation et une normalisation du gel en utilisant le marqueur de poids moléculaire (PM). Par la suite, la comparaison des profils de migration avec ceux disponibles dans la base de données est réalisée en vue d'obtenir un dendrogramme qui permet d'analyser, interpréter les résultats et de calculer le degré de similitude entre les isolats étudiés et avec les souches de référence disponibles.



## Références bibliographiques

1. Alain K. ; Approches culturelles et moléculaires des assemblages microbiens associés aux polychètes hydrothermaux de la famille ALVINELLIDAE. Thèse de Doctorat, 2003, Bretagne occidentale.
2. Amann R. et Ludwig W. (2000) ; Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Rev.* 24 : 555-565
3. Amoozegar MA, Malekzadeh F, Malik KA (2003a) Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *J Microbiol Meth* 52:353–359
4. Amoozegar MA, Malekzadeh F, Malik KA, Schumann P, Sproer C (2003b) *Halobacillus karajensis* sp. nov., a novel moderate halophile. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:059–1063
5. Antonio VENTOSA, JOAQUÍN J. NIETO, 1 AND AHARON OREN 2; 1998) Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 1092-2172/98/\$04.0010. June 1998, p. 504–544.
6. Anton J., Llobet-Brossa E., Rodriguez-Valera F., Amann R. (1999). Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environmental Microbiology*, 1, 6, pp.517-523.
7. Benlloch S., Martinez-Murcia A. J., Rodriguez-Valera F. (1995). Sequencing of bacterial and archaeal 16S rRNA genes directly amplified from a hypersaline environment. *Systematic and Applied Microbiology*, 18, pp.574-581.
8. Bitton G. (1999) *Wastewater Microbiology*. 2ème éd., Wiley-Liss, New York, 592p.
9. Bonnete F., Madern D., Zaccai G. (1994). Stability against Denaturation Mechanisms in Halophilic Malate-Dehydrogenase Adapt to Solvent Conditions. *Journal of Molecular Biology*, 244, 4, pp.436-447.
10. Campanile F., Bartoloni A., Bartaleisi F., Barbone S., Mangani V., Mantella V., Nicoletti G., Paradisi F., Russo G., Strohmeyer M. et Stefani S. (2003) ; Molecular alterations of vanA element in vancomycin-resistant enterococci isolated during a survey of colonized patients in an Italian intensive care unit. *Microb Drug Resist.* 9 : 191-199.
11. Caumette P., Matheron R., Raymond N., Relexans J.-C. (1994). Microbial mats in the hypersaline ponds of Mediterranean salterns (Salins-de-Giraud, France). *FEMS Microbiology Ecology*, 13, 4, pp.273-286.
12. Corre E. ; Approche moléculaire de la diversité microbienne de deux environnements extrêmes : les sources hydrothermales profondes et les réservoirs pétroliers. Thèse de Doctorat, 2004, BRETAGNE OCCIDENTALE.
13. Cowan DA. *Industrial enzymes*. In: Moses V, Cape RE (eds), *Biotechnology, the Science and the Business*, Reading, UK, Harwood Academic Publishers, 1991, pp. 311–340.



14. Cytryn E., Minz D., Oremland R. S., Cohen Y. (2000). Distribution and diversity of archaea corresponding to the limnological cycle of a hypersaline stratified lake (Solar Lake, Sinai, Egypt). *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 8, pp.3269-3276.
15. Dan N. P., Visvanathan C., Basu B. (2003). Comparative evaluation of yeast and bacterial treatment of high salinity wastewater based on biokinetic coefficients. *Bioresource Technology*, 87, 1, pp.51-56.
16. Dombek, P. E., Johnson, L. K., Zimmerley, S. T., and Sadowsky, M. J. (2000) ; 'Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources', *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2572–2577.
17. Duckworth A. W., Grant W. D., Jones B. E., van Steenberg R. (1996). Phylogenetic diversity of soda lake alkaliphiles. *FEMS Microbiology Ecology*, 19, 3, pp.181-191.
18. Eisenberg H., Mevarech M., Zaccai G. (1992). Biochemical, Structural, and Molecular-Genetic Aspects of Halophilism. *Advances in Protein Chemistry*, 43, pp.1-62.
19. Feurer C., Irlinger F., Spinnler H. E., Glaser P., Vallaeys T. (2004).  
Assessment of the rind microbial diversity in a farm house-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 3, pp.546-556.
20. Fry J. C. (2000). Bacterial diversity and unculturables. *Microbiology Today*, 27, pp.186-188.
21. Glamoclija M., Garrel L., Berthon J., et Garcia P. L. (2004) ; Biosignatures and Bacterial Diversity in Hydrothermal Deposits of Solfatara Crater, Italy. *Geomicrobiology Journal*, 21: 529–541
22. Geert Huys (2003):Microscale DNA extraction from Gram-positive Bacteria: GES(PITCHER)method. *Lett.Appl.Microbiol.*8,151-156
23. Guillaume-Gentil O, Scheldeman P., Marugg J., Herman L., Joosten H., et Heyndrickx M. (2002) ; Genetic Heterogeneity in *Bacillus sporothermodurans* as Demonstrated by Ribotyping and Repetitive Extragenic Palindromic-PCR Fingerprinting. *Appl. Environ.Microbiol.*, 68 : 4216–4224
24. Heyndrickx M., Herman L., Vlaes L., Butzler J.-P., Wildemaue C., Godard C. & De Zutter L. (2007) : Multiple typing for the epidemiological study of the contamination of broilers with *Salmonella* from the hatchery to the slaughterhouse. *Journal of Food Protection*, 70: 323-334
25. Hobel C F V ; Access to Biodiversity and New Genes from Thermophiles by Special Enrichment Methods. Thèse de Doctorat, 2004, Reykjavik.
26. Hollibaugh J. T., Wong P. S., Bano N., Pak S. K., Prager E. M., Orrego C. (2001). Stratification of microbial assemblages in Mono Lake, California, and response to a mixing event. *Hydrobiologia*, 466, 1-3, pp.45-60.
27. Horikoshi K., Grant W. D. (1998) *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*. Wiley-Liss, New York, 322p.
28. Kamekura M. (1998). Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles*, 2, 3, pp.289-295.



29. Kamekura M, Onishi H (1974) Halophilic nuclease from a moderately halophilic *Micrococcus varians*. *J Bacteriol* 119:339–344
30. Kushner D. J. (1985) In: *The Bacteria*. Academic Press, London, vol. 8, pp.171.
31. Lahav R., Nejdat A., Lahav R., Abeliovich A., Fareleira P. (2002).  
The identification and characterization of osmotolerant yeast isolates from  
chemical wastewater evaporation ponds. *Microbial Ecology*, 43, 3, pp.388-396.
32. Larsen H. (1962) Halophilism. In: *The bacteria: a treatise on structure and function*. Stanier R. C. ed.,  
Academic Press, New York, vol. 4, pp.297-342.
33. Li X., Ma H., Wang Q., Matsumoto S., Maeda T., Ogawa H.I. (2009) ; Isolation,  
identification of sludge-lysing strain and its utilization in thermophilic aerobic digestion for waste  
activated sludge. *Bioresource Technology*, ;100 (9):2475-2481;
34. Litchfield C. D., Gillevet P. M. (2002). Microbial diversity and complexity in hypersaline environments:  
A preliminary assessment. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, 1, pp.48-55.
35. Lozach E. (2001). Le sel et les micro-organismes. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Veterinaire  
d'Alfort, Maisons-Alfort, 98p.
36. Martinez-Murcia A. J., Acinas S. G., Rodriguez-Valera F. (1995).  
Evaluation of prokaryotic diversity by restrictase digestion of 16S rDNA directly  
amplified from hypersaline environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 17, 4,  
pp.247-255. 148. McMeekin T. A., Nichols P. D., Nichols D. S., Juhasz A.,  
Franzmann P. D. (1993).
37. Martin S, Marquez MC, Sanchez-Porro C, Mellado E, Arahal DR, Ventosa A (2003) *Marinobacter*  
*lipolyticus* sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1383–  
1387
38. Mevarech M, Frolow F, Gloss LM (2000) Halophilic enzymes: Proteins with a grain of salt. *Biophys*  
*Chem* 86:155–164
39. Mouné S., Manac'h N., Hirschler A., Caumette P., Willison J. C., Matheron R.  
(1999). *Haloanaerobacter salinarius* sp. nov., a novel halophilic fermentative bacterium that reduces  
glycine-betaine to trimethylamine with hydrogen or serine as electron donors; emendation of the genus  
*Haloanaerobacter*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, pp.103-112.
40. Niederberger T.D., Ronimus R. S., Morgan H.W. (2008) ; The microbial ecology of a high-temperature  
near-neutral spring situated in Rotorua, New Zealand. *Microbiological Research* 163, 594-603
41. Onishi H, Kamekura M (1972) *Micrococcus halobius* sp. n. *Int J Syst Bacteriol* 22:233–236
42. Oren A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and  
applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, 1, pp.56-63.
43. Patel R, Dodia M, Singh SP (2005) Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic  
*Bacillus* sp.: Production and optimization. *Proc Biochem* 40:3569–3575
44. Pedros-Alio C. (2004) Trophic ecology of solar salterns.



- In: Halophilic Microorganisms. A. V. ed., Springer, Berlin, pp.33-48.
45. Prescott L.M., Harley J.P., Donald A. Microbiologie, De boeck université, 2eme édition française, 2003, 28-29 ; 128.
46. Rappé M. S., Giovannoni S. J. (2003).The uncultured microbial majority. Annual Review of Microbiology, 57, pp.369-394.
47. R'himou EL HAMOUMI, Mohamed DAKKI, Hamid RGUIBI IDRISSE, Mohamed RADI (2003). Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar (FDR) ,Catégories approuvées dans la Recommandation 4.7 modifiée par la Résolution VIII.13 de la Conférence des Parties contractantes .
48. Rodríguez-Valera F., Acinas S. G., Anton J. (1999).Contribution of molecular techniques to the study of microbial diversity in hypersaline environments.  
In: Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments. Oren A. ed., CRC Press, Boca Raton, pp.27-38.
49. Sadfi-Zouaoui1 N., B. Essghaier1, M. R. Hajlaoui2, M. L. Fardeau3, J. L. Cayao13, B. Ollivier3 and A. Boudabous (2007) : Ability of Moderately Halophilic Bacteria to Control Grey Mould Disease on Tomato Fruits. J. Phytopathology 156, 42–52 .
50. Sanchez-Porro C, Martin S, Mellado E, Ventosa A (2003) Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. J Appl Microbiol 94:295–300
51. Schindler F. (2003).Biological pretreatment combined with hotochemical and physical post treatment of textile finishing industry effluents - An integrated approach. Thèse de doctorat, Anna University, Chennai.
52. Sierra GA. (1957) Simple method for the selection pf lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Leewenhoek 23:15–22.
53. Sorokin D. Y., Kuenen J. G. (2005). Chemolithotrophic haloalkaliphiles from soda lakes. FEMS Microbiology Ecology, 52, 3, pp.287-295.
54. Vaerewijck, M. J. M., De Vos P., Lebbe L., Scheldeman P., Hoste B. et Heyndrickx M.,(2001): Occurrence of Bacillus sporothermodurans and other aerobic sporeforming species infeed concentrate for dairy cattle. J. Appl. Microbiol. 91:1074–1084.
55. Vaerewijck, M. J. M., De Vos P., Lebbe L., Scheldeman P., Hoste B. et Heyndrickx M., (2001): Occurrence of Bacillus sporothermodurans and other aerobic sporeforming species in feed concentrate for dairy cattle. J. Appl. Microbiol. 91:1074–1084.
56. Ventosa A, Sanchez-Porro C, Martin S and Mellado E (2005) Halophilic archaea and bacteria as a source of extracellular hydrolytic enzymes. In: Gunde-Cimerman A, Oren A, Plemenitas A (eds) Adaptation of Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria and Eukarya. Springer-Verlag, Heidelberg, pp337354



- 
57. Ventosa A, Nieto JJ, Oren A (1998) Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 504–544
58. Versalovic et al., 1997 ; Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol lett.* 205 : 31-36
59. Ward B. B., Martino D. P., Diaz M. C., Joye S. B. (2000). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria from hypersaline Mono Lake, California, on the basis of 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 7, pp.2873-2881.
60. Welsh D. T., Lindsay Y. E., Caumette P., Herbert R. A., Hannan J. (1996). Identification of trehalose and glycine betaine as compatible solutes in the moderately halophilic sulfate reducing bacterium, *Desulfovibrio halophilus*. *Fems Microbiology Letters*, 140, 2-3, pp.203-207.