

RESULTATS ET DISCUSSION

I. ANALYSE DES ÉCHANTILLONS D'EAUX DU LAC SALÉ

I.1. Analyse physico-chimique des échantillons

Nous avons procédé à l'analyse physico-chimique des eaux du lac salé à partir de 07 stations différentes, le but étant de savoir s'il y a des différences ou analogies dans la composition chimique des eaux : les résultats sont résumés dans le tableau 7.

Tableau 7. Valeurs des paramètres physicochimiques de 07 échantillons d'eaux de Chott el Beidha. Hammam Essokhna Sétif. Algérie (les concentrations des ions sont en g/l).

Code de la station	NE	DE	CD	SD	CO	CC	SC
pH	7.23	7.03	Nd	7.16	7.24	7.73	6.16
Na ⁺	23.7	12	11.7	20.1	25.5	2.9	56.8
K ⁺	0.6	0.3	0.3	0.4	0.6	0.1	1.4
Mg ²⁺	1.77	1.84	1.9	3.34	3.41	4.04	6.35
Ca ²⁺	1.582	1.904	1.862	2.464	2.086	2.044	2.674
Cl ⁻	31.941	33.345	35.802	54.756	64.935	73.125	80.73
Conductivité (ms/cm)	nd	36.1	27.9	69.7	68	45.1	95
Salinité (g/Litre)	57.703014	60.23941	64.678103	98.919452	117.30832	132.10397	145.84278

Théoriquement, la salinité désigne la masse totale de substances solides dissoutes dans un kilogramme d'eau de mer. Cette définition ne pouvant être applicable en routine, la notion de chlorinité a été mise en avant en se basant sur le fait que le chlorure qui représente 55 % de la salinité pouvait être mesuré avec précision. Depuis 1969 une nouvelle relation empirique, plus précise entre la salinité et la chlorinité est entrée en vigueur :

$$S_{\text{‰}} = 1.80655 \times \text{Cl } \text{‰} \text{ (Rodier et al., 2009).}$$

***TDS:** abréviation anglaise de Total Dissolved Solids. Terme utilisé comme synonyme de salinité ou de charge totale dissoute (CTD) (Kloppmann et al., 2011).

Dans notre étude nous avons remarqué qu'il existe un gradient croissant de la salinité de la sebkha (de la région nord vers l'extrême sud) ; du site NE vers le site SD. La région nord de la sebkha (NE) est l'endroit où la charge totale dissoute en ions est la plus faible (57.7 g/kg). La salinité augmente progressivement jusqu'à une valeur maximale (145.8 g/litre) situé à l'extrême sud (SD). D'après la classification des eaux par Kharaka et Hanor (2005), on peut appeler les eaux de notre site d'étude « Chott el Beidha » comme étant une Saumure: une eau dont la valeur de salinité est supérieure à la valeur moyenne de celle de l'eau de mer, c'est-à-dire plus de 35 g/L de sels.

Nous avons constaté que l'augmentation de salinité s'accompagne d'une augmentation de la conductivité des eaux du Chott. Cette dernière reflète la minéralisation sous forme ionique, sachant que la conductivité est essentiellement déterminée par les ions Cl^- , à un moindre degré pour les autres ions. Pour ce qui est des autres éléments chimiques majeurs comme le sodium, potassium, magnésium et calcium la charge totale dissoute est très variée. Les ions Na^+ et Cl^- sont dominants comme le calcium et le magnésium qui présentent des valeurs proportionnelles à la salinité, cette dernière est très variable à travers la grande surface du lac. L'action conjuguée d'un climat semi aride caractérisé par une évaporation intense et la présence d'un grand complexe thermal (Hammam Essoukhna) fait que la plupart des sols et eaux ont subi un phénomène de salinisation, quotidiennement la sebkha reçoit les eaux de la station thermale, l'évolution spatio-temporelle des chlorures dans les eaux de sebkha présente la même allure que celle de la salinité. La nature géologique régionale, les lessivages des roches et, des sols et les eaux thermales de Hammam Essoukhna (riches en chlorures) pourraient être à l'origine des ces fluctuations.

La comparaison des résultats d'analyses physicochimiques de Chott el Beidha, avec 07 milieux salins et hypersalins qui se situent en Algérie et dans d'autres pays par une approche statistique a permis de faire une comparaison de Chott el Beidha avec les autres sites (les paramètres physicochimiques comparés sont ceux illustrés dans le tableau 7 à l'exception de la conductivité). Les sites sont respectivement : le lac salé Himmilat à Boussada, le lac Sidi Ameer (Algérie), le grand lac salé USA, le lac Bhayander (India), la mer caspienne, la mer Aral et la mer morte. Les données numériques ont été standardisées sous formes de variables. La méthode statistique employée est une classification hiérarchique ascendante (CAH). Les résultats sont montrés dans la figure 12. Le diagramme obtenu montre les similitudes ou bien les dissimilitudes entre les différentes stations par le biais des distances euclidiennes.

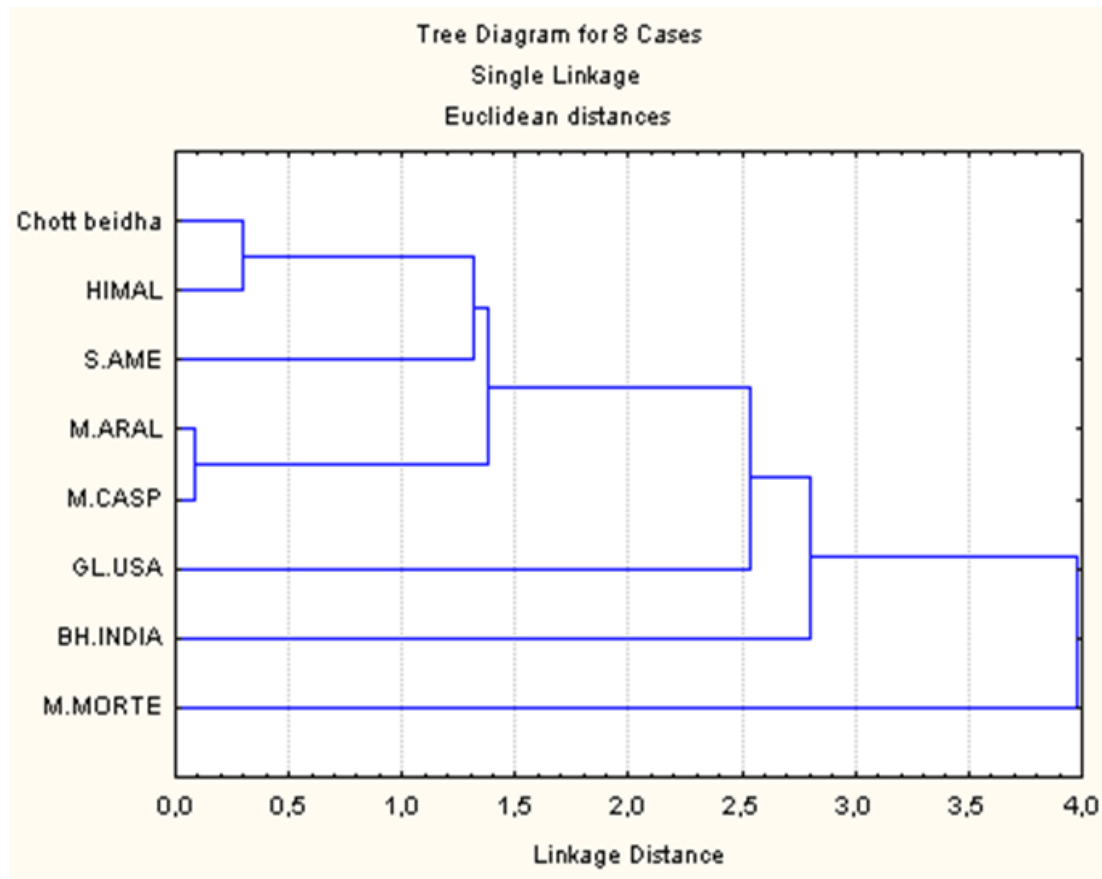


Figure 12. Dendrogramme de comparaison des paramètres physicochimiques des eaux de Chott el Beidha avec quelques environnements hypersalins.

La comparaison des paramètres physicochimiques montre que Chott el Beidha se rapproche du lac salé Himmilat de Boussada en Algérie, le lac salé de Sidi Ameer vient en deuxième position.

La mesure de la température des eaux du lac salé donne une valeur de 12°C.

I.2. Analyse microbiologique des échantillons

L'opération précédemment entreprise et qui nous a permis d'aboutir à la composition chimiques des 07 stations du lac salé a été intégralement reprise dans son fond et dans sa forme dans l'espoir d'aboutir au dénombrement de la flore totale aérobie mésophile. Même à ce niveau, une échelle de variation a été constatée.

I. 2. 1. Dénombrement des germes totaux (ou flore totale aérobie mésophile : F. T. A. M)

Le dénombrement des germes aérobies mésophiles est utilisé comme indicateur de pollution : Un nombre relativement élevé de germes aérobies mésophiles est noté surtout dans

les stations DE et CD, ce nombre diminue progressivement au fur et à mesure que la salinité augmente. Le dénombrement de ces germes nous renseigne sur le degré de contamination de la sebkha qui est un milieu naturel (protégé par la convention RAMSAR). Tous ces résultats montrent que la sebkha étudiée dispose d'une flore ubiquiste importante. Cette flore diminue progressivement au fur et à mesure que la salinité augmente. Cet écosystème est caractérisé par une alimentation en eau temporelle et spatiale fortement inégale, qui cause des fluctuations importantes pour les microbes et réduit leur capacité à survivre, parce qu'ils doivent répondre rapidement à la dessiccation et s'adapter aux concentrations élevées en sel (Torvik et Øvreås, 2008).

I.2.2. Colimétrie

On enregistre un résultat négatif de la colimétrie pour les échantillons d'eau prélevés à partir des stations NE, DE, CO, SD et SC. Alors que ceux prélevés à partir des stations CC et CD montrent la présence respectivement de 9 et 20 coliformes totaux. On note l'absence totale de coliformes fécaux.

Le risque sanitaire relié à la présence de bactéries du groupe des coliformes totaux est faible, l'absence d'*Escherichia coli* est suffisante pour affirmer que le site d'étude n'est pas contaminé par des matières fécales. D'après nos prospections au niveau de la zone d'étude, nous avons noté l'absence de déchets (d'origine animale et/ou humaine) dans les terrains avoisinants la sebkha (C'est un site préservé par la convention international Ramsar).

I.2.3. dénombrement des Streptocoques fécaux

Le degré de pollution des eaux est évalué par le dénombrement "*d'indicateurs de contamination fécale*", en général coliformes fécaux (*Escherichia coli*) et streptocoques (groupe D). Ces germes sont choisis, car ils sont très nombreux dans les eaux usées.

Nous avons remarqué l'absence des Streptocoques fécaux dans tous les échantillons d'eau à travers toutes les stations de la sebkha.

L'absence des indicateurs de contaminations fécales, explique que ces germes n'ont pas trouvé les conditions de milieu favorable pour se multiplier (richesse en matières organiques facilement biodégradables, température...), ajoutons à cela les effets néfastes de la salinité. Beaucoup de travaux confirment cette hypothèse. Les résultats des travaux de

(Chedad et Assobhei, 2007), mettent en relief l'importance de la lumière et de la salinité de l'eau dans l'inactivation des coliformes fécaux, Cette étude montre aussi clairement que la survie des coliformes fécaux diminue, mais leur disparition rapide est loin d'être totale.

La salinité est aussi un facteur de stress très important que subissent les bactéries de pollution fécale en arrivant au milieu salin, où la bactérie doit rétablir l'équilibre osmotique entre le milieu extérieur et son cytoplasme. Ce rétablissement met en jeu des mécanismes complexes qui font appel à l'augmentation de la concentration de certains solutés osmo-régulateurs dans la bactérie (Chedad et Assobhei, 2007).

I. 2. 4. Recherche et dénombrement des spores des anaérobies sulfitoréducteurs

La présence des anaérobies sulfitoréducteurs est constatée uniquement dans la station SC de la sebkha. L'envahissement des milieux de culture de la station SC par des clostridiiums sulfito-réducteurs (anaérobies facultatives) indique la présence de sulfure de fer dans cette zone d'échantillonnage et c'est ce dernier qui provoque le dégagement de H₂S. Ce gaz est un révélateur de condition anaérobies et d'un potentiel d'oxydoréduction trop bas. Il provoque de mauvaises odeurs (Slimani, 2006).

Les bactéries anaérobies strictes à Gram positif et sporulées réduisent les sulfites en sulfures d'hydrogène. Les spores résistent au stress environnemental en particulier aux radiations solaires. Parmi les spores anaérobies sulfito-réductrices, celles de *Clostridium perfringens*, espèce le plus souvent associée aux fèces d'animaux à sang chaud. Les spores de bactéries sulfito-réductrices sont considérés comme des indicateurs de l'élimination des kystes de protozoaires (Henze *et al.*, 2008).

I. 2. 5. Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*

La lecture du résultat de l'ensemencement du milieu de Chapman est négative pour les *Staphylococcus aureus* dans la totalité des stations de la sebkha (absence des colonies dorées), cependant il y a présence d'un nombre très important de colonies transparentes d'un diamètre très petit dans le milieu Chapman ensemencé à partir des stations SD, CC, SC, et CO. Les stations CD, DE, et NE sont toutes négatives.

Le milieu de Chapman qui contient des peptones, de l'extrait de viande, du Mannitol, rouge de phénol et surtout du chlorure de sodium avec 75g/l permet la culture des coques

Gram+ catalase+ et quelques autres bactéries (*Bacillus*, *Enterococcus*...). Les colonies jaunes sont mannitol+ et les colonies rouges sont mannitol- (Joffin et Leyral, 2006).

La remarque la plus importante est que le milieu de Chapman a permis la culture d'un nombre important de bactéries surtout les stations SD, CO, CC et SC, ce qui démontre que toutes ces bactéries se cultivent en milieu hypersalé. Les colonies bactériennes transparentes peuvent être des bactéries appartenant au genre *Bacillus*, ou des espèces non pathogènes du genre *Staphylococcus*.

Le tableau 8 récapitule les résultats du dénombrement de la flore totale et pathogène dans l'eau du Cott el Beidha.

Tableau 8. Résultats du dénombrement de la flore totale et pathogène dans l'eau du lac salé exprimés en U.F.C.

	NE	DE	CD	SD	CO	CC	SC
F.T.A.M.	150	>300	280	53	53	<10	<10
C. totaux	-	-	20	-	-	9	-
C. fécaux	-	-	-	-	-	-	-
S. fécaux	-	-	-	-	-	-	-
S.A.S.R.	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-

II. ÉTUDE DE LA BIODIVERSITÉ BACTÉRIENNE PAR LES MÉTHODES CULTURALES

II. 1. Enrichissement et isolement de la flore halophile et halotolérante

L'ensemencement des échantillons d'eau, des différents sites étudiés, sur les trois milieux d'isolement préparés a mené à l'isolement de plus de 200 souches. La majorité des souches sont isolées dans le milieu gélosé naturel qui contient l'eau de sebkha. Le nombre de souches isolées à partir du milieu conventionnel I et II est très réduit et ne dépasse pas les deux souches sur le milieu I, qui contenaient 25% d'NaCl. Il est à noter que le temps d'incubation avant l'apparition des 02 souches sur le milieu conventionnel I est très long (un mois et demi à 40°C). Les résultats de l'isolement sont résumés dans le tableau 9.

Tableau 9. Nombre d'isolats selon le milieu d'isolement utilisé.

Station	Nombre d'isolats		
	Milieu naturel	Milieu conventionnel	Milieu conventionnel
		I (25% NaCl)	II (15% NaCl)
NE	31	00	Envahissement
DE	32	00	Envahissement
CD	42	00	Envahissement
SD	54	00	09
CO	17	00	08
CC	56	01	03
SC	24	02	04

La majeure partie des souches isolées proviennent des milieux gélosés préparés à base de l'eau de sebkha. Pour chaque station la composition chimique du milieu est différente du fait de la variation qualitative et quantitative de la charge totale en ions, ce qui a engendré une diversité importante *via* ces milieux. Ajoutons à cela que le fait de préparer un milieu de culture qui se rapproche de l'écosystème d'origine de la flore microbienne a donné plus de chance aux bactéries de s'adapter et survivre. En analysant le nombre d'isolats, on constate que l'eau provenant du centre du lac salé (CC) a permis l'isolement du nombre le plus élevé d'isolats (56 UFC). L'eau de la station qui se situe au centre ouest du lac salé (CO) a permis d'avoir un faible nombre d'isolats (17 UFC). La figure 13, est un exemple qui montre les colonies de différents germes isolés sur le milieu gélosé préparé à base de l'eau de sebkha.

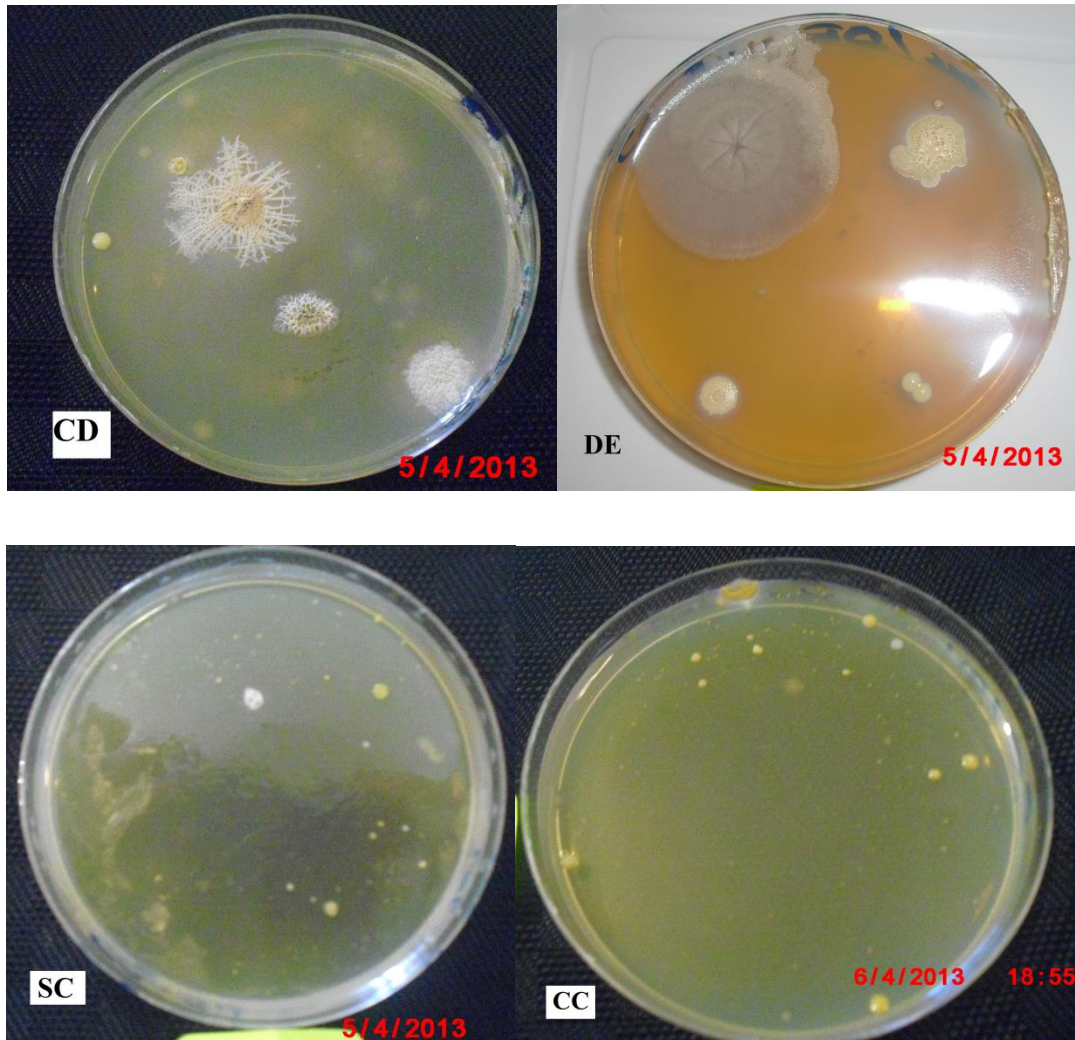


Figure 13. Aspect des colonies sur le milieu gélosé naturel (stations CD, DE, SC et CC).

Contrairement aux milieux naturels de sebkha, le milieu conventionnelle I (25% NaCl), est un milieu extrême qui a empêché la survie de presque la totalité de la flore ubiquiste (la salinité de notre site d'étude est inférieure à 15%), ce qui a créé des fluctuations pour la survie de la majorité de la flore microbienne banale. Cependant le milieu à 25% NaCl n'est favorable que pour les microorganismes qui tolèrent des conditions extrêmes de salinité.

Le milieu conventionnel II est un milieu étudié de sorte que la salinité et surtout la composition en ions se rapprochent du site d'étude (la quantité du magnésium est ajustée de sorte qu'elle n'inhibe pas la multiplication bactérienne), et c'est pour cette raison que le nombre d'isolats dans le milieu conventionnel II (15 % NaCl) est nettement supérieur à celui trouvé dans le milieu conventionnel I (25% NaCl). Tous ces résultats rejoignent beaucoup des travaux sur la biodiversité des lacs salés et notamment les travaux de Hacène et *al.* (2004)

sur la biodiversité de la microflore procaryotique du lac salé d'El Golea dans le Sahara Algérien, qui décrit la distribution quantitative et qualitative de la flore microbienne : ils remarquent une décroissance significative de la diversité microbienne lorsque la salinité augmente.

26 souches ont été retenues pour une complète caractérisation. Les isolats sont désignés selon un code composé de deux lettres (qui sont l'abréviation du site d'échantillonnage), et d'un numéro arbitraire donné à la souche isolé.

Les codes des isolats retenus pour la suite de l'étude sont les suivants :

CD15, CO8, SC3, SD47, SD36, SD40a, DE22, CD5, SD7₂, SD49a, CD26, DE14, CD18, SD24, SD7₁, SC12, CO8a, SD40b, SD40c, SD40d, SD35, CD2, SD7b, SD7a.

II. 2. Caractérisation des isolats

II. 2. 1. Étude morphologique des isolats

La caractérisation macroscopique et microscopique des souches est illustrée dans le tableau 10. L'aspect des colonies a été analysé et a permis de déterminer la morphologie (forme, et surtout la pigmentation des colonies). La plupart des souches forment sur milieux gélosés des colonies beiges à surface lisse, plates, circulaires, à bords réguliers et dont le diamètre varie de 1 à 2 mm. Il y a d'autres qui sont oranges, plates, ombiliquées et parfois à centre surélevé. La pigmentation rouge des colonies est observée uniquement dans le milieu conventionnel I (25% NaCl). Ce type de pigmentation est un trait caractéristique des Archaea halophiles extrêmes dû à un pigment de type caroténoïde (Grant *et al.*, 2001; Oren et Rodriguez-Valera, 2001). Un autre aspect macroscopique est observé dans un seul type d'isolat qui apparaît blanc très collé à la gélose avec une odeur caractéristique du sol, cela nous conduit à penser que cette souche pourrait appartenir au *Actinomycètes*. Les actinomycètes ont été également isolés dans de nombreux environnements aquatiques. Ils ont été isolés à partir des eaux de mer et sédiments marins, d'eau douce et dans les marécages salés (Djaballah, 2010).

La coloration de Gram effectuée selon la technique de Dussault (1955) a révélé une dominance des bâtonnets à Gram négatif et souvent disposés en paires ou en chaînettes (Figure 14).

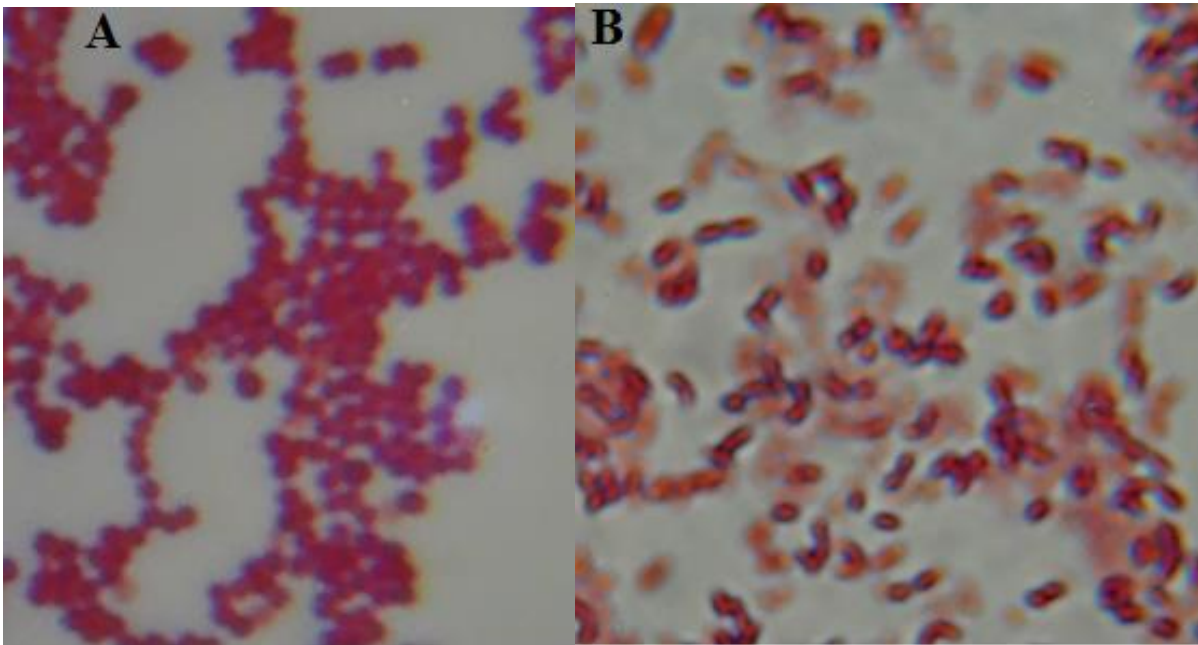


Figure 14. Exemples d'observation microscopique au grossissement 100. **A** : la souche CD2, **B** : la souche SC12. Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Cyber-shot DSC-WX50. Full HD (zoom x5).

II.2. 2. Mise en évidence des enzymes respiratoires

La plupart des souches étudiées sont catalase et cytochrome oxydase positives. Elles sont donc aérobies ou anaérobies facultatives. Le tableau 10 récapitule les résultats de l'étude morphologique des isolats ainsi que les résultats de la mise en évidence des enzymes respiratoires.

Tableau 10. Caractères morphologiques des isolats.

Souche	Pigmentation	Gram	Morphologie cellulaire	Catalase	Oxydase
SC3	Orange	+	Bâtonnet	+	+
SC7a	Orange	-	Bâtonnet	+	+
SC12	Orange	-	Bâtonnet	+	-
SD7 ₁	Marron	+	Bâtonnet	+	+
SD7 ₂	Orange	-	Bâtonnet	+	+
SD35	Crème	+	Cocci	+	-
SD36	Beige	+	Cocci	+	-
SD40a	Crème	+	Cocci	+	-
SD40b	Transparente	+	Bâtonnet	+	+
SD40c	Beige	+	Bâtonnet	+	+
SD40d	Beige	+	Cocci	+	+
SD47	Marron	+	Cocci	+	-
SD49a	Crème	+	Bâtonnet	+	-
SD24	Crème	+	Cocci	+	+
DE14	Crème	+	Cocci	-	-
DE22	Crème	+	Cocci	-	-
CD2	Beige	+	Cocci	+	-
CD5	Beige	+	Cocci	-	-
CD15	Orange	-	Bacille	-	-
CD18	Beige	-	Bâtonnet	-	+
CD26	Crème	+	Bâtonnet	-	-
CO8	Orange	+	Bâtonnet	-	+
CO8a	Orange	+	Bâtonnet	-	+
BO1	Rouge	-	Cocci	-	-
BO2	Rouge	-	Cocci	-	+
SC7b	Orange	-	Bâtonnet	+	+

(+ : résultat positif, - : résultat négatif).

II. 2. 3. Tolérance des souches à différentes concentrations de sels

Pour vérifier la tolérance des différentes souches aux concentrations croissantes d'NaCl, nous avons utilisé le milieu gélose nutritive. 07 milieux de gélose nutritive ont été préparés à cet égard : 0.5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% d'NaCl. Les résultats sont répertoriés dans le tableau 11.

Tableau 11. Croissance des isolats sur milieu gélose nutritive à salinité croissante.

Souche	Croissance sur gélose nutritive						
	0.5% NaCl	5% NaCl	10% NaCl	15% NaCl	20% NaCl	25% NaCl	30% NaCl
SC3	+	+	+	+	+	-	-
SC7a	+	+	+	+	+	-	-
SC12	+	+	+	+	+	-	-
SD7 ₁	+	+	+	+	+	-	-
SD7 ₂	+	+	+	+	+	-	-
SD35	+	+	+	+	-	-	-
SD36	+	+	+	+	+ faiblement	-	-
SD40a	+	+	-	-	-	-	-
SD40b	+	+	+	+	+	-	-
SD40c	+	+	+	+	-	-	-
SD40d	+	+	+	+	+	-	-
SD47	+	+	+	+faiblement	-	-	-
SD49a	+	+	+	-	-	-	-
SD24	+	+	+	-	-	-	-
DE14	+	+	+	+	+	-	-
DE22	+	+	+	-	-	-	-
CD2	+	+	+	+	-	-	-
CD5	+	+	+	+faiblement	+faiblement	-	-
CD15	+	+	+	+	+	-	-
CD18	+	+	+	-	-	-	-
CD26	+	+	+	+faiblement	-	-	-
CO8	+	+	+	+	+	-	-
CO8a	+	+	+	+	+	-	-
BO1	-	-	-	-	+	+	+
BO2	-	-	-	-	+	+	+
SC7b	+	+	+	+	+	-	-

(+ : résultat positif, - : résultat négatif, +faiblement : croissance faible).

La majorité des souches isolées de Chott el Beidha poussent à 0.5% d'NaCl : 92.30% des isolats sont non halophiles c'est-à-dire que le sel n'est pas indispensable pour leur croissance, même sans l'ajout du sel les bactéries poussent rapidement, à l'exception de 02

isolats qui sont halophiles strictes. Le même résultat est observé après l'ajout de 5% d'NaCl. En ajoutant 10% d'NaCl, 88.46% des isolats tolèrent cette concentration de sel. En augmentant la salinité, le nombre d'isolats halotolérant diminue progressivement. A 20% d'NaCl, 61.53% des isolats sont capables de résister à cette forte salinité. Les isolats halophiles stricts ont besoin d'un minimum de 20% d'NaCl pour pousser. A 25 et 30% d'NaCl seules les deux souches halophiles strictes (BO1 et BO2) sont capables de résister à de telles salinités (figure 15).

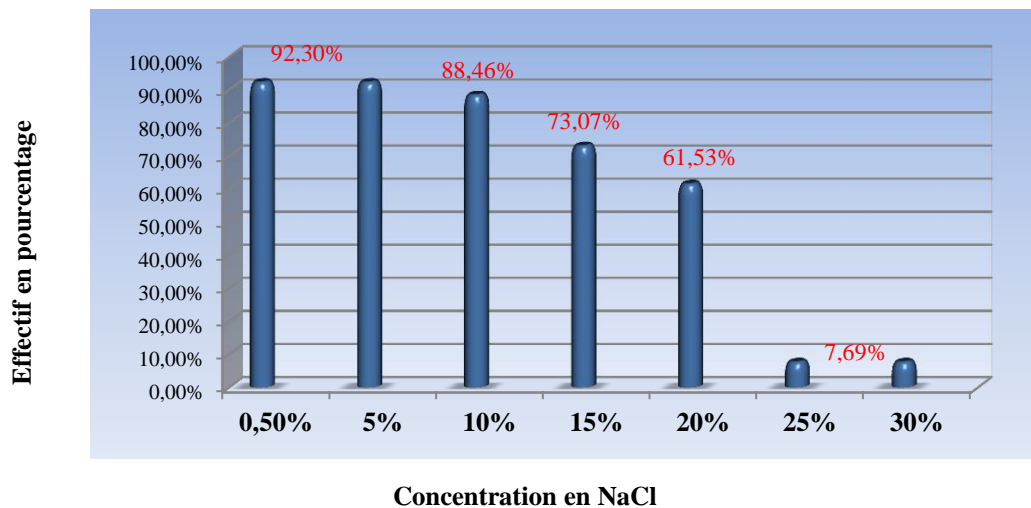


Figure 15. Tolérance aux concentrations d' NaCl des isolats de Chott el Beidha.

II. 2. 4. Étude du polymorphisme génétique et séquençages du gène codant pour la sous unité ribosomale 16S des isolats

II. 2. 4. a. Extraction de l'ADN génomique

II. 2. 4. b. Amplification du gène codant pour la sous unité 16S et les ITS (Internal Transcribed Spacer)

Pour étudier et caractériser la diversité de communautés bactériennes, l'identification par analyse de la zone intergénique (ITS) 16S-23S représente l'une des approches les plus pertinentes. La séquence intergénique (ITS) 16S-23S est la portion du génome comprise entre les gènes codant pour les ARN ribosomiaux 16S et 23S, et peut comporter la partie 5' de 16S et la partie 3' de 23S. Nous avons procédé dans un premier temps à l'amplification de cette zone hypervariable et ensuite à la migration des produits d'amplification. L'application de l'approche PCR-ITS nous a permis de mieux regrouper et identifier 24 souches bactériennes testées. Les résultats de l'amplification sont visualisés sur un gel d'agarose à 2% comme le montre la figure 16 et 17.

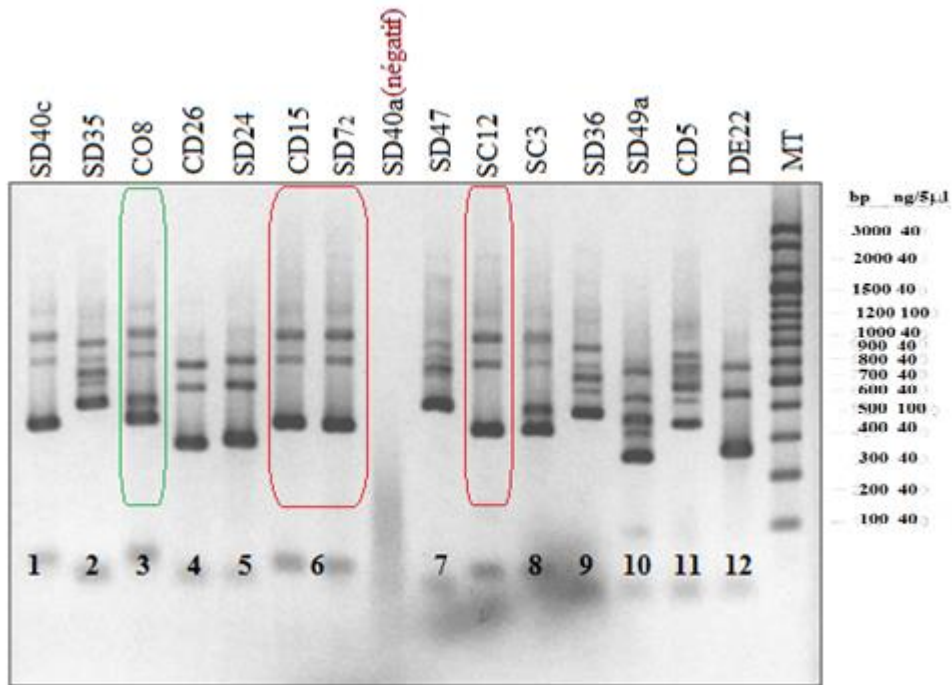


Figure 16. Photo du gel PCR-ITS de 15 souches bactériennes isolées à partir de Chott el Beidha Hammam Essoukhna .Sétif. (MT : Marqueur de Taille, plusieurs isolats ont le même haplotype comme les souches en couleur rouge).1-12 : Numéros d'haplotype.

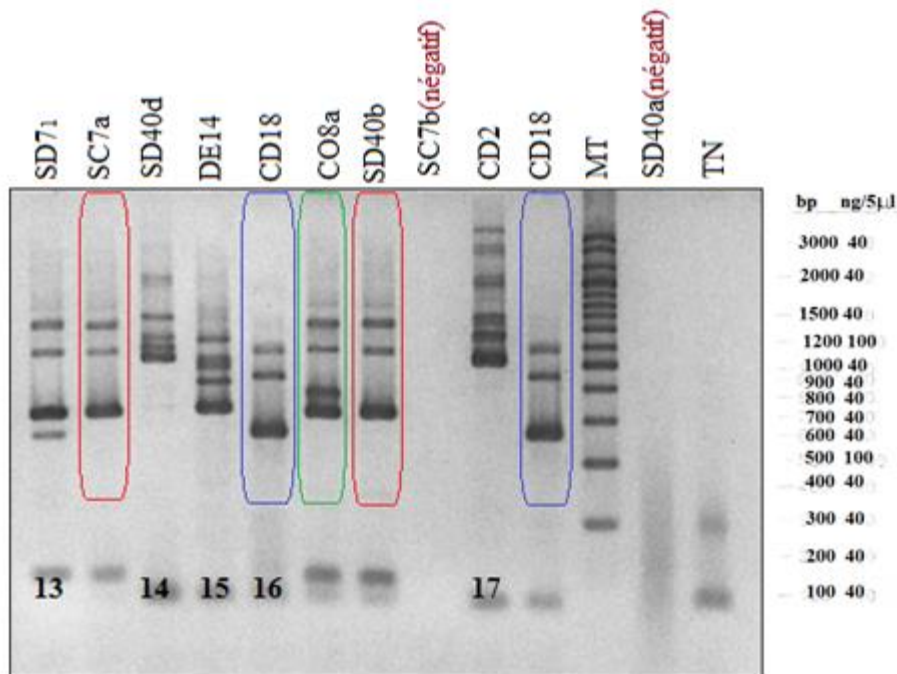


Figure 17. Photo du gel PCR-ITS de 09 souches bactériennes isolées à partir de Chott el Beidha Hammam Essoukhna. Sétif. (13-17 : Numéros d'aplotype).

Afin de déterminer la taille de chaque fragment de gènes amplifiés sur le gel d'électrophorèse un marqueur de taille 100 bp est utilisé. Ce dernier permet la quantification des bandes d'ADN d'une taille qui varie de 100 à 3000 paires de bases.

Les résultats de l'amplification des gènes ITS pour les 24 souches bactériennes testées, ont montré qu'il existe 17 haplo types distincts. Les différents types d'ITS sont composés par des bandes reproductibles avec des tailles en nucléotides différentes. Le modèle le plus représenté est l'haplotype ITS **6**, trouvé dans 5 isolats, ce modèle est composé de 03 bandes reproductibles de 300,600 et 800 paires de bases. Les 05 isolats sont : CD15, SD7₂, SC12, SC7_a, SD40_b, qui sont isolés à partir de stations différentes de la sebkha, ils sont tous classés comme des bactéries halotolérantes, qui tolèrent jusqu'à 20% d'NaCl. Le deuxième modèle représenté est l'haplotype ITS **3**, trouvé dans 2 isolats (CO8, CO8a). Ils sont tous halotolérants (20% d'NaCl) et isolés dans la station CO. L'haplotype **3** est composé de 04 bandes distinctes. Les autres haplotypes **1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17** sont représentés par un isolat pour chaque haplotype, où le nombre de bandes est différent d'un isolat à l'autre. Les analyses des gènes ITS pour les isolats SC7b et SD40a n'ont pas donné de résultats (absence de bandes) : il se peut que la quantité d'ADN ne soit pas importante faute d'une mauvaise extraction.

Vu le nombre d'isolats qui ont fait l'objet d'analyses des espaces intergéniques (24 isolats), et tenant compte des résultats obtenus (nombres d'haplotypes distincts), on constate que le lac salé « Chott el Beidha. Hammam Essoukhna » présente une diversité bactérienne importante. Tous ces résultats rejoignent beaucoup de travaux sur la biodiversité des lacs salés par l'approche de l'amplification des espaces intergéniques, et notamment les travaux de Guesmi et *al.* (2013), qui a porté sur 5 lacs salés de Tunisie (Sabkhet el Melah, Chott Djerid, Oasis Ksar el Ghilan, Sabkhet Ennaoul, Esahline) ; sur 336 isolats formant des spores un total de 65 haplotypes distincts est observé. Ces mêmes travaux ont montré que dans certains cas même les isolats qui possèdent des haplotypes identiques peuvent appartenir à des espèces différentes.

L'analyse approfondie des résultats des ITS, et la comparaison avec les tests physiologiques et enzymatiques, nous permettent de dire que les souches étudiées présentent une variabilité génétique considérable en dépit des similitudes des haplotypes décrits en haut (exemple de la souche SD7₂ qui possèdent un haplotype identique à la souche SC12, mais la différence dans les tests de l'amylase est très significative ; ce qui est en accord avec d'autres

travaux récents déjà cités. La même remarque est valable pour les isolats SC7a, SD40b et CD15.

Les séquences intergéniques (ITS) présentes entre les ADNr16S et 23S ou entre les ADNr 23S et 5S sont extrêmement variables en taille et en séquence et permettent donc la distinction d'espèces bactériennes très proches, et c'est pour cette raison qu'une variabilité génétique importante existe à l'intérieur des mêmes haplotypes.

II. 2. 4. c. Séquençage et analyse phylogénétique des séquences de l'ARNr 16S

Sur un total de 24 souches bactériennes représentant 17 haplotypes distincts, nous avons procédé à l'identification moléculaire par le gène 16S de 10 haplotypes qui sont respectivement les haplotypes : **1, 3, 6, 7, 8, 9,10 ,13, 14, 17** , représentant les isolats suivants : SD40c, CO8, CO8a , CD15, SD7₂, SC12, SC7_a, SD40b , SD47, SC3, SD36 , SD49a, SD71, SD40d et CD2 . Pour l'haplotype 3 et 6, une seule souche est identifiée par le gène 16S, puisqu'il s'agit probablement des mêmes isolats (les résultats des ITS le confirment).

Ainsi, en se basant sur ces critères et sur les analyses phylogénétiques obtenues, nous avons identifié 08 espèces dominées par le genre *Bacillus* et *Staphylococcus*. Les membres du genre *Bacillus* ont été isolés dans presque tous les habitats naturels et à partir de beaucoup d'autres sources, en raison de la capacité de transport de leurs spores et leur remarquable capacité de résistance et de dormance, qui permet aux bactéries de survivre longtemps dans des habitats défavorables (Claus et Berkeley, 1986). Beaucoup de travaux sur la biodiversité des environnements hyper salés (Garabito et *al.*, 1998; Berrada et *al.*, 2012), ont montré que la majorité des isolats à partir des sols, sédiments et marécages salins , ont été assignés aux genre *Bacillus* , ils sont majoritairement classés comme des microorganismes halotolérants extrêmes qui peuvent croître dans la plupart des cas jusqu'à 20 ou 25% de sels.

Les fragments d'ADN séquencés vont de 700 à 800 pb approximativement. Les séquences obtenues ont été comparées à celles des séquences présentes dans la base de données GenBank, en utilisant le programme BLAST (tableau 12). Dans de nombreux travaux, un pourcentage de similitude supérieur ou égal à 97% est suffisant pour une identification au genre mais il faut un pourcentage d'au moins 99 % pour déterminer l'espèce (Drancourt et *al.*, 2000).

Tableau 12. Analyse par séquençage de l'ADNr 16S des isolats des marais salants de Chott el Beidha.

Code des isolats	Nbre de bp séquencées	% de similitude	Identification basée sur le voisin le plus proche (nearest neighbor)	N° de séquence (accession number)
SD40d	720	99%	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	KF280295.1
SD36	720	99%	<i>Staphylococcus cohnii</i>	KF777403.1
CO8	707	98%	<i>Bacillus baekryungensis</i>	JQ800441.1
CD2	700	99%	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	EU379304.1
SD47	730	99%	<i>Staphylococcus sp.</i>	KC581940.1
SD40c	700	99%	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	EU530644.1
SC3	700	99%	<i>Bacillus baekryungensis</i>	JQ800441.1
CD15	750	99%	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	AB536976.1
SD49a	700	99%	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	KC844789.1
SD7 ₁	800	99%	<i>Bacillus sp.</i>	AY690699.1

La capacité à former des endospores explique l'abondance des espèces du genre *Bacillus* dans la majorité des environnements (terrestres et aquatiques), y compris les milieux extrêmes. Dans une étude récente de biodiversité du genre *Bacillus*, où des combinaisons de techniques de culture dépendante et indépendante ont été utilisées, les résultats montrent que beaucoup d'espèces du genre *Bacillus* se trouvent dans les isolats issus de méthodes classiques, avec un nombre élevé par rapport aux méthodes moléculaires. Ce qui suggère que les bactéries formant des spores se cultivent facilement avec les méthodes standard bien qu'elles ne représentent qu'une petite proportion de la communauté microbienne, cela pourrait s'expliquer par le fait que dans les milieux hostiles, les bactéries sont limitées du point de vue énergétique et après l'exposition à de fortes concentrations en substrats dans les milieux d'isolements classiques, ils subissent un choc qui contribue à la lyse des cellules. En revanche, les endospores contiennent suffisamment d'énergie pour la germination et sont spécifiquement adaptées pour répondre rapidement à la disponibilité en substrats et la formation d'une cellule végétative et par conséquent on peut s'attendre qu'ils croissent facilement et en nombre plus élevé que les autres microorganismes après transfert sur les milieux ordinaires. D'autres part, les endospores contiennent une paroi très rigide, elle résiste parfois aux procédures d'extraction des acides nucléiques. Ajoutons à cela le fait que la

salinité élevée des lacs salés participe à la conservation et à la préservation des spores (Sass et *al.*, 2008).

En plus des membres du genre *Bacillus*, notre étude a montré l'existence des espèces du genre *Staphylococcus* à savoir : *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* et *Staphylococcus sp.* Toutes ces espèces sont des microorganismes halotolérants et dans certains cas ils sont halotolérants extrêmes car, ils tolèrent jusqu'à 20% d'NaCl. La majorité des travaux approuvent la présence des *Staphylococcus* dans les lacs salés aussi bien en Algérie, Chott Melghir, el Goléa (les travaux de Hacéne et *al.*, 2004), qu'à l'étranger. Les travaux de Berada sur le lac salé du Bas Loukkos (marécage salin au Maroc) indiquent la présence de ces microcoques du genre *Staphylococcus* à l'exception de *Staphylococcus haemolyticus*. Ces formes coccidiques sont relativement résistantes à des environnements à activité de l'eau réduite et tolèrent très aisément des environnements desséchés et fortement salé.

L'analyse et l'identification par le gène 16S, nous ont permis de montrer l'existence d'une souche bactérienne SD49_a où la séquence du gène 16S a montré une similitude avec *Brevibacterium halotolerans*, appartenant à la famille des *Brevibacteriaceae*, selon le manuel de systématique de bactériologie Bergey's. Volume 5, Edition 2012 (Whitman et *al.*, 2012). Elle est affiliée aux Actinomycètes : bactéries filamenteuses, Gram positif du grand Phylum : *Actinobacteria*. Dans ce même volume les auteurs affirment que récemment et selon des séquences de gènes ribosomiaux et qui ne sont pas publiées, les espèces *Brevibacterium halotolerans* et *frigoritolerans*, sont mal classées et représentent des souches de *Bacillus*.

Le genre *Pseudoalteromonas* est apparu dans les résultats du séquençage du gène 16S, ce genre appartient au Phylum des *Gammaproteobacteria*. Ce sont des bacilles Gram négatif.

L'analyse phylogénétique basée sur le séquençage de l'ADNr 16S indique que parmi les 04 genres obtenus du lac et sédiments salins, les genres *Bacillus* et *Staphylococcus* sont dominants avec 08 souches représentées par des espèces bien adaptées aux lacs et environnements salins. Les autres genres obtenus sont représentés par une souche pour le genre *Pseudoalteromonas* et une souche de *Brevibacterium* appartenant aux Actinomycètes.

Toutes les études récentes ont prouvé que des micro-organismes de ce type sont très répandus dans les sols et marécages salins (Ventosa et *al.*, 2008).

L'identification moléculaire des isolats cités en haut et la connaissance des séquences nucléotidiques du gène 16S, nous a permis d'introduire les séquences des souches identifiées et des souches de références types présentes dans NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et de construire un cladogramme, en utilisant le programme Clustal W2 (Figure 18).

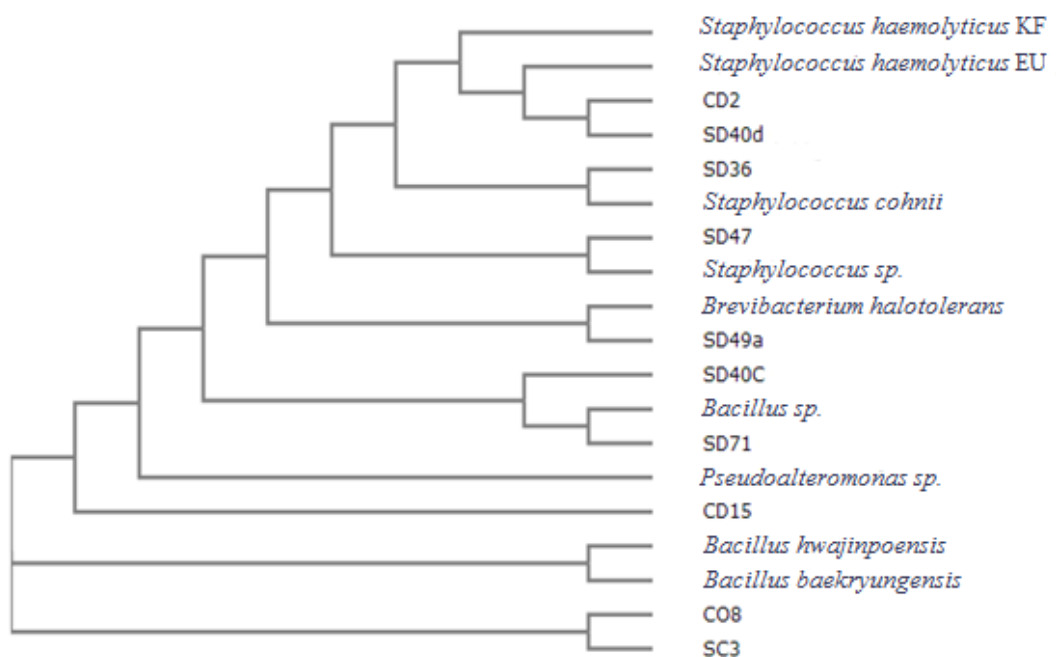


Figure 18. Cladogramme de similitudes, basé sur la comparaison des séquences des gènes codant l'ARNr 16S, des bactéries halotolérantes identifiées et les séquences de références apparentées.

La relation de descendance qui relie les espèces actuelles aux espèces ancestrales est représentée de façon simplifiée par un graphe appelé arbre phylogénétique ou cladogramme de similitudes. Afin d'évaluer cette relation de descendance, il est important de lire verticalement le cladogramme. Nous avons noté dans un premier lieu que les isolats de Chott el Beidha se situent au même niveau (distance) que leurs homologues souches de références. Les sommets externes (ou feuilles), sont situés au bout des branches terminales et correspondent aux taxa étudiés (espèces actuelles). Les sommets internes sont des nœuds, qui correspondent à des ancêtres inférés. Ces espèces seront d'autant plus proches que le nœud les

reliant est proche des feuilles et d'autant plus éloignées que celui-ci est plus profond (plus proche de la racine).

Les résultats de l'analyse phylogénétique basée sur le séquençage de l'ADNr 16S sont très concluantes et viennent confirmer les résultats des ITS : en dépit de leur pourcentage de similitude élevé ($\geq 99\%$) avec les souches de références les plus proches pour le séquençage de l'ADNr 16S, les souches isolées de Chott el Beidha présentent une variation génétique considérable, exemple de la souche SD40d et la souche CD2 qui appartiennent à la même espèce différent dans la production des enzymes hydrolytiques et possèdent des profils ITS distinct .

Un autre exemple est celui de la souche CO8, présentent un degré de similitude de 98% avec leur parent phylogénétique le plus proche : Du point de vue taxonomique cette souche pourraient être une souche potentiellement nouvelle.

III. ESSAI D'ÉTUDE DE LA BIODIVERSITÉ MICROBIENNE PAR LES TECHNIQUES MOLÉCULAIRES

III. 1. Extraction d'ADN génomique à partir des échantillons d'eaux

La qualité de l'ADN obtenue après les étapes d'extraction a été analysée sur un gel d'agarose à 0.8%. La présence dans les 07 échantillons (figure 19), de bande d'ADN purifié et non fragmenté, cet ADN constitue donc une bonne matrice pour réaliser les amplifications PCR.

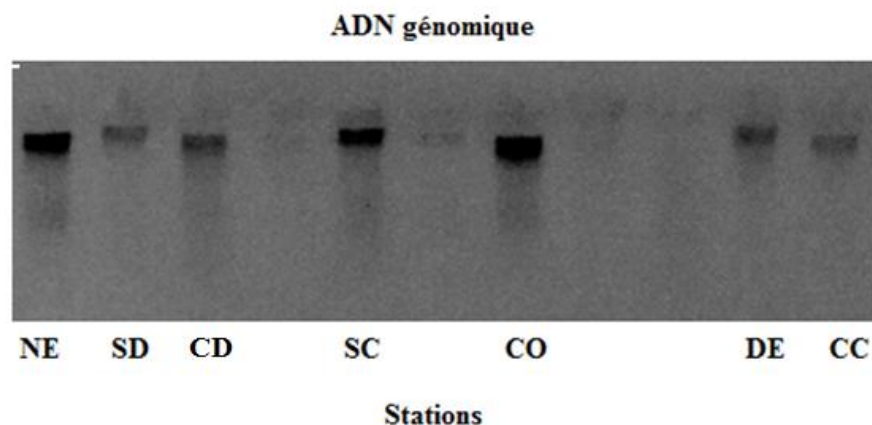


Figure 19. Révélation des bandes de l'ADN génomique total à partir de l'eau de sebkha sur gel d'électrophorèse d'agarose 0.8%. De gauche à droite : la nomenclature des différentes stations de la prise d'essais au niveau de la sebkha.

III. 2. Amplification de l'ADN par la PCR « polymerase Chain Reaction » PCR-DGGE

La PCR-DGGE a pour principe l'étude du polymorphisme d'un gène donné qui est amplifié par PCR. L'amplification génère des fragments de même taille mais de séquences différentes selon l'organisme ciblé. Les différents fragments sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel contenant un gradient de dénaturation chimique tels que l'urée et le formamide (Muyzer *et al.*, 1993).

Au terme de l'amplification, une vérification des produits PCR est indispensable pour la continuité du travail : la présence d'ADN total après la phase d'extraction n'est pas suffisante pour la réussite des opérations d'amplification d'ADN : c'est un travail d'optimisation qui est souvent difficile à mettre en œuvre. Pour notre étude malgré la présence de bandes d'ADN dans le premier gel d'électrophorèse pour les sept stations étudiée, nous avons réussi à amplifier seulement l'ADN de deux stations. La première optimisation décrite dans le chapitre matériels et méthode qui consiste à prélever 1µl de l'ADN extrait de chaque station n'a pas donné de résultats. Lors de la deuxième optimisation la quantité d'ADN utilisé pour les six stations est la suivante : 1/50µl-2µl-1µl-2µl-1/50-2µl dans l'ordre pour les stations : NE-SD-DE-SC-CO-CC. Un seul résultat est apparu sur le gel d'électrophorèse (figure 20) qui correspond à la station « SC ».

Une troisième optimisation est testée dans le but de réussir l'amplification de l'ADN (PCR-DGGE), bien sûr en changeant chaque fois les quantités d'ADN. L'ordre de dépôt dans les puits et les quantités d'ADN utilisées est le suivant : NE-DE-CO-CC-SD-T-/1/50µL-2µL-1/50µL-3µL-2µL. Une seule bande est apparue sur le gel d'électrophorèse, elle correspond à la station SD (Figure 20).

Ce faible rendement de la PCR-DGGE est très connu pour les chercheurs de l'écologie microbienne, et c'est l'ajout de cette pince GC dans l'amorce d'amplification qui a diminué considérablement le rendement de la PCR et permis probablement la formation de dimères. Pour augmenter le rendement, différentes techniques peuvent être employées. Le nombre de cycles, temps d'appariement et la quantité d'ADN de départ peuvent être augmentés (Abecia *et al.*, 2004).

- L'étude de la biodiversité microbienne par les techniques moléculaire n'a pu donner tous les résultats escomptés et ce, consécutivement à une série de contraintes évoquées

partiellement et aux quelles s'ajoute le facteur temps qui ne nous a pas permis malheureusement d'aller jusqu'au bout, c'est pourquoi les étapes telles : la migration des produits PCR issue de l'amplification de l'ADN de la communauté bactérienne de l'eau de sebkha, dans un gel DGGE et le séquençage de ces gels, ont été reconduites.

Bandes d'ADN génomique

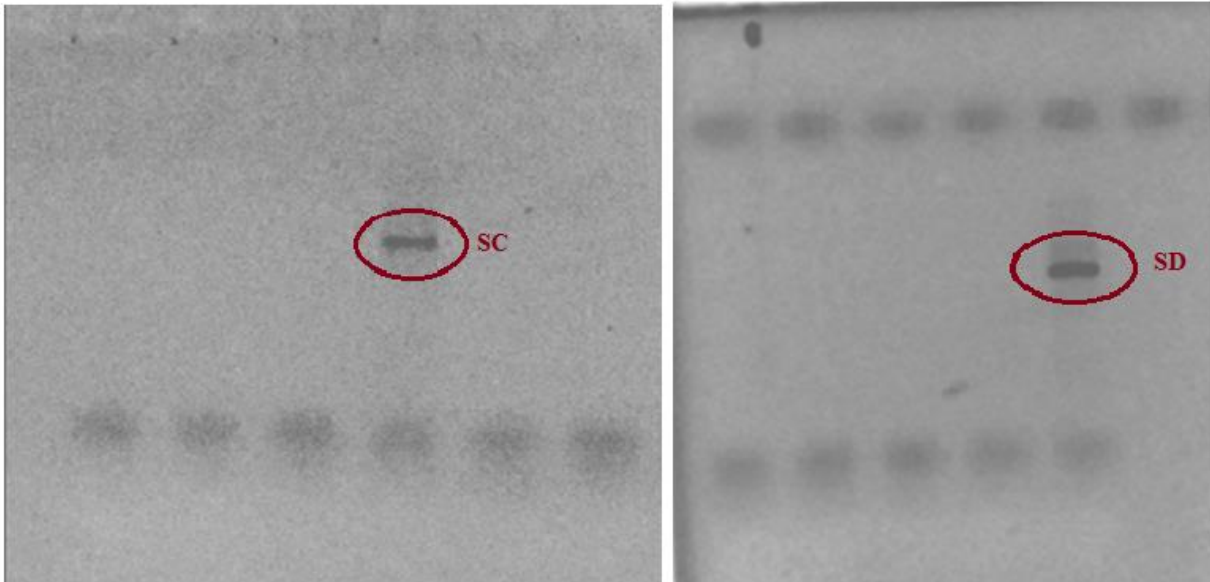


Figure 20. Photos du gel PCR- DGGE des échantillons d'ADN issues des différentes stations. Deux bandes sont apparue correspondant aux stations SC et SD.

IV. MISE EN ÉVIDENCE DE DEUX ACTIVITÉS HYDROLYTIQUES EXTRACELLULAIRES

IV. 1. Détermination de l'activité amylolytique

L'activité amylolytique des 24 isolats est résumée dans le tableau 12. L'activité amylolytique est observée avec un nombre important d'isolats, 13 isolats ont montré une activité qui varie d'une souche à l'autre : 04 souches produisent des amylases avec une activité très intense (le diamètre de la zone d'hydrolyse est très important), cependant des zones d'hydrolyse moyenne sont observées avec 06 isolats et les autres sont relativement faibles. Un exemple d'hydrolyse de l'amidon est représenté par la figure 21.

Sur les 24 souches testées plus de la moitié des isolats (54.16%) produisent des amylases (figure 22).

IV. 2. Détermination de l'activité Estérase

Le résultat de l'activité estérase est très diversifié : sur un total de 24 souches, 17 souches (73.83%) ont montré une activité estérase remarquable, un exemple de l'activité estérase est illustré dans la figure 21. L'activité estérase est différente d'une souche à l'autre (le diamètre de la zone claire entourant les colonies bactériennes différent d'une souche à l'autre). Le tableau 13 récapitule les résultats des tests enzymatiques des 24 souches étudiées.

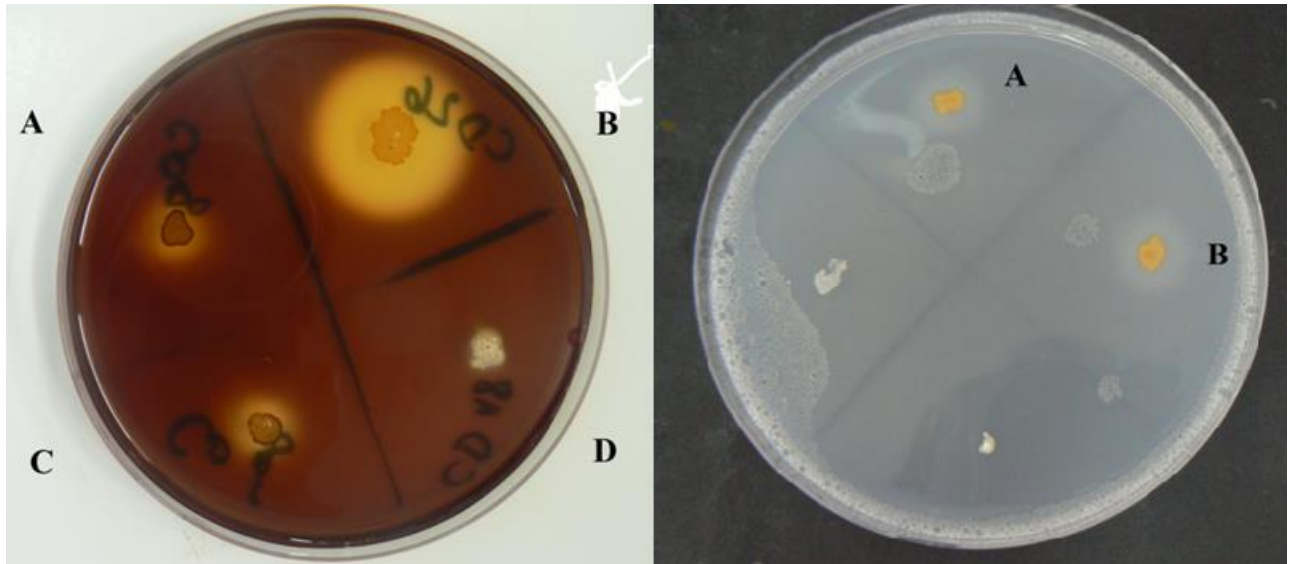


Figure 21. Mise en évidence de l'activité amylolytique (à gauche) de quelques isolats, **A** : la souche CO8 (activité faible), **B** : CD 26(activité très intense), **C** : CO8' (activité faible), **D** : la souche CD 18 (absence d'activité), et de l'activité estérase (à droite), présence d'activité estérase pour les souches **A** et **B**.

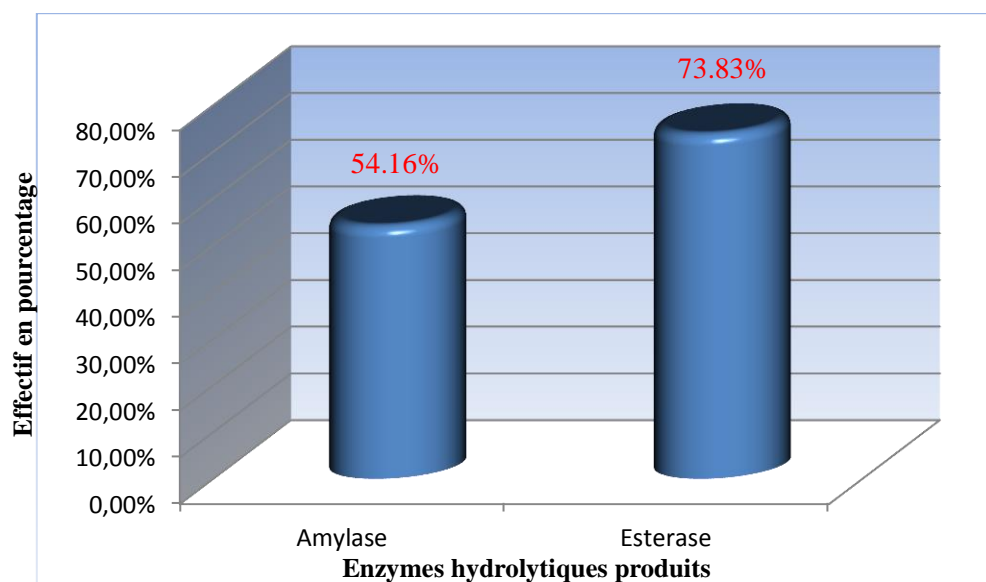


Figure 22. Production d'enzymes extracellulaires chez les bactéries halotolérantes de Chott el Beidha.

Le tableau 13 récapitule les résultats des tests enzymatiques des 24 souches étudiées.

Tableau 13. Activités amylolytique et estérase de 24 isolats de Chott el Beidha.

Souche	Production d’Amylase	Production d’Estérase
SC3	++	++
SC7a	++	++
SC12	++	++
SD7 ₁	++	+
SD7 ₂	+++	+
SD35	-	-
SD36	-	-
SD40a	+++	+++
SD40b	-	++
SD40c	-	-
SD40d	++	++
SD47	-	-
SD49a	+++	++
SD24	-	+
DE14	-	+
DE22	-	++
CD2	-	-
CD5	-	-
CD15	+	++
CD18	-	-
CD26	+++	++
CO8	++	++
CO8a	++	++
BO1	nd	nd
BO2	nd	nd
SC7b	++	++

nd : non déterminée, - : pas d’activité, + : activité faible, ++ : activité moyenne, +++ : une activité très intense.

Il est à noter que deux isolats halophiles stricts obtenus dans ce travail n'ont fait l'objet d'aucune application biotechnologique et leurs potentialités restent encore à découvrir.

Plusieurs travaux ont mis l'accent sur le potentiel biotechnologique des bactéries halotolérantes, avec de nombreuses applications industrielles. Parmi les espèces que nous avons identifiées dans ce travail, 5 sont décrites comme étant à potentiel biotechnologique par la production d'enzymes (amylases et estérases), il s'agit des espèces : *Pseudoalteromonas sp.*, *Brevibacterium halotolerans*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Bacillus baekryungensis*, *Bacillus sp.*

Vu son potentiel biotechnologique riche, le genre *Pseudoalteromonas* est un groupe de bactéries marines qui appartient à la classe des *Gammaproteobacteria*. Ce genre a attiré beaucoup d'attention dans le domaine de l'écologie microbienne par ces produits naturels. Les espèces pigmentées du genre *Pseudoalteromonas* sont capables de produire un ensemble de composés de poids moléculaire faible et élevé avec des propriétés antibactériennes, antifongiques, algicides et diverses autres activités pharmaceutiques pertinentes. Ces composés formés incluent : des protéines toxiques, des exopolymères polyanioniques, substances phénoliques et pyrroliques, des alcaloïdes, des peptides et une gamme de composés contenant du brome. Les recherches dans le domaine de l'écologie microbienne ont montré que le genre *Pseudoalteromonas* est impliqué dans la formation de biofilms dans les milieux marins, interviennent efficacement dans la boucle microbienne (Bowman, 2007). Ce genre est impliqué aussi dans les associations avec des organismes eucaryotes supérieurs. Longeon *et al.* (2004), ont prouvé les effets probiotiques du genre *Pseudoalteromonas*.

La souche CD15 appartenant au genre *Pseudoalteromonas*, est capable de produire des enzymes hydrolysant l'amidon ainsi que des estérases. Les travaux de Won *et al.* (2011), ont permis la mise en évidence d'une nouvelle alpha amylase produite par une souche de *Pseudoalteromonas sp.* isolée dans la Corée.

Les Actinomycètes ont un potentiel biotechnologique très riche et diversifié. Beaucoup de travaux mettent l'accent sur les métabolites produites par des souches appartenant au genre *Brevibacterium*, notamment les espèces *B. linens* et *B. epidermis*. Les travaux de Pastor *et al.* (2010), évoquent la production de l'ectoïne par ces mêmes espèces.

Pour ce qui est de la souche SD49_a identifiée : *Brevibacterium halotolerans*, nous avons montré que cette souche possède une activité amylasique et estérase intense.

Les isolats CD2 et SD40_d, identifiés comme étant : *Staphylococcus haemolyticus*, ont montré une activité enzymatique différente : seule la souche SD40_d est capable d'hydrolyser l'amidon et possède à la fois une activité estérase remarquable. Oh et al. (1999), ont réussi à isoler une souche de *Staphylococcus haemolyticus* capable de sécréter une lipase, cette dernière possède une stabilité thermique remarquable, même à 70°C l'enzyme est actif après 150 minutes (Gupta et al., 2004).

Les souches CO8, SC3, CO8_a identifiées et apparentées à *Bacillus baekryungensis* sont des isolats trouvés principalement dans les sédiments marins, ils tolèrent jusqu'à 20% d'NaCl et de ce fait ils sont des halotolérantes extrêmes. Notre étude a montré que ces bactéries produisent des amylases et des estérases, ces enzymes hydrolytiques permettent à ces bactéries de jouer un rôle important dans les processus biogéochimiques dans leurs habitats naturels.

Des travaux sur l'écologie du genre *Bacillus* dans les sédiments marins, montrent que *Bacillus baekryungensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus firmus* et *Bacillus cereus* produisent de l'ammoniac, les nitrites, l'hydrogène sulfureux (H₂S), et métabolisent beaucoup de composés organiques (Yanan et al., 2004).

La souche SD7₁ qui appartient au genre *Bacillus sp.* est douée d'une activité amylolytique et estérase importante. Ce résultat confirme le potentiel biotechnologique énorme du genre *Bacillus*.

Les souches du genre *Bacillus sp.* constituent d'importants producteurs de molécules bioactives pouvant être utilisées dans différents domaines, en particulier ceux de l'agriculture et l'environnement. Ces molécules sont actives sur les membranes et douées de puissantes activités antimicrobiennes (Amziane et al., 2012).

Une nouvelle souche bactérienne halotolérante est découverte par Klouche et al. (2013). Cette bactérie (LMB3981), isolée du lac salé d'El Goléa est affiliée au genre *Bacillus* et douée d'une activité antimicrobienne très importante.